

***In vitro* und *in vivo* geführter
immunhistologischer Nachweis von
Modifikationen des Vimentinnetzwerkes in den
Zellen des artikulären Knorpels**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Yvonne Janke
geboren am 14.11.1981 in Hamburg

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. Karl-Jürgen Halbhuber, Institut für Anatomie II, FSU Jena
2. PD Dr. Alexander Berndt, Institut für Pathologie, FSU Jena
3. Ph.D.D.Sc. Jürgen Mollenhauer, NMI, Reutlingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.11.2008

Meiner Familie

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematik der Intermediärfilamente.....	11
Tabelle 2: LSM-Daten	31
Abbildung 1: Darstellung der Zonen des hyalinen Knorpels (Mow und Hayes 1991).....	6
Abbildung 2: Sekundärstruktur der Intermediärfilamente (aus Parry und Steinert 1999)	13
Abbildung 3: Gitterstruktur und Schärfebereich des eingebrachten Gitters	31
Abbildung 4: Vimentin-Netzwerk (100x).....	32
Abbildung 5: Galerieansicht z-Stapel	33
Abbildung 6: CH65-Netzwerk (100x)	34
Abbildung 7: Bilderstapel des CH65-Netzwerkes rundlicher Chondrozyten (100x).....	35
Abbildung 8: Mehrkanalbild (100x)	36
Abbildung 9: Vergleich Vimentin und CH65 (100x).....	36
Abbildung 10: Schematische Darstellung von Vimentin (A) und CH65 (B).....	37
Abbildung 11: optische Schnitte eines rundlichen Chondrozyten (100x)	39
Abbildung 12: Rundlicher Chondrozyt als 3D-Rekonstruktion (100x).....	39
Abbildung 13: Vimentinmarkierung (100x)	40
Abbildung 14: z-Stapel Vimentin markierter Chondrozyten (100x)	41
Abbildung 15: CH65-Markierung (100x)	42
Abbildung 16: optische Schnitte zur Illustration des CH65-Netzwerkes (100x)	42
Abbildung 17: Mehrkanalbild (100x).....	43
Abbildung 18: Gegenüberstellung Vimentin vs. CH65 (100x).....	43
Abbildung 19: Schemata des Vimentin- (A) und CH65-Netzwerkes (B).....	44
Abbildung 20: z-Stapel eines pflastersteinartigen Chondrozyten (100x)	46
Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion eines pflastersteinartigen Chondrozyten	46
Abbildung 22: Vimentin-Netzwerk (100x).....	47
Abbildung 23: CH65-Markierung (100x)	47
Abbildung 24: Fibroblastoider Chondrozyt (100x).....	48
Abbildung 25: LSM-Aufnahmen fibroblastoider Chondrozyten (63x).....	48
Abbildung 26: LSM-Aufnahmen fibroblastoider Chondrozyten (63x).....	49
Abbildung 27: Netzwerk-Schemata von Vimentin (A) und CH65 (B).....	49
Abbildung 28: Galerieansicht optischer Schnitte durch einen fibroblastoiden Chondrozyten (100x)	50
Abbildung 29: Fibroblastoider Chondrozyt als 3D-Rekonstruktion (100x)	51
Abbildung 30: Vimentin- und CH65-Netzwerk (100x).....	52
Abbildung 31: Fibroblasten (100x)	53
Abbildung 32: optische Schnitte durch Fibroblasten (100x)	54
Abbildung 33: schematische Darstellung des Vimentin- und CH65-Netzwerkes in Fibroblasten	55
Abbildung 34: Fibroblast (3D-Rekonstruktion)	55

Abbildung 35: schräg verlaufende Chondrozyten der mittleren Zone (100x)	56
Abbildung 36: 3D-Rekonstruktion (100x)	57
Abbildung 37: Galerieansicht z-Stapel (100x)	58
Abbildung 38: Chondrozyten der superficialen Zone.....	59
Abbildung 39: Horizontalaufnahme superficialer Chondrozyten (100x)	60
Abbildung 40: optische Schnitte durch die oberflächliche Zone (100x)	62

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Foetal calf serum
IFAPs	Intermediärfilament-assoziierte Proteine
IFs	Intermediärfilamente
kDa	Kilodalton
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
RA	Rheumatoidarthritis / Gelenksentzündung
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris - gepufferte physiologische Kochsalzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 Knorpel/Gelenkknorpel	3
2.1.1 Die extrazelluläre Matrix.....	7
2.1.2 Der Chondrozyt.....	7
2.2 Zytoskelett.....	9
2.2.1 Intermediärfilamente/Vimentin.....	10
2.2.2 CH65	16
2.3 Zielstellung.....	17
3 MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien	18
3.1.2 Pufferlösungen.....	19
3.1.3 Fixierungen	20
3.1.4 Nährmedien und Zusätze	20
3.1.5 Immunhistologie.....	21
3.1.6 Laborgeräte	21
3.1.7 Glaswaren.....	22
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.9 Computersoftware.....	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Zellbiologische Methoden	24
3.2.1.1 Gewinnung von Gelenkknorpel.....	24
3.2.1.2 Kultivierung von Knorpelzellen	24
3.2.1.3 Gewinnung und Kultivierung von Fibroblasten.....	25
3.2.2 Histologische Methoden.....	26
3.2.2.1 Anfertigung von Kryostat-Schnitten	26
3.2.2.2 Anfertigung von Paraffin-Schnitten	26
3.2.2.3 Fixierung	27
3.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
3.2.3 Immunhistologische Methoden.....	28
3.2.3.1 Vimentin	28
3.2.3.2 Darstellung des CH65	29
3.2.3.3 Doppelfärbungen.....	29
3.2.3.4 Zellkern-Darstellung / DNA-Färbung	30
3.2.4 Auswertung und Dokumentation	30

4	ERGEBNISSE	32
4.1	In vitro Kultivierung	32
4.1.1	Organisation von Vimentin und CH65 im Chondrozyten.....	32
4.1.1.1	Der runde Chondrozyt	32
4.1.1.2	Der plastersteinartige Chondrozyt	40
4.1.1.3	Der fibroblastoide Chondrozyt	47
4.1.2	Organisation von Vimentin und CH65 im Fibroblasten	52
4.2	In vivo Präparate	56
4.2.1	Die tiefe und mittlere Schicht.....	56
4.2.2	Die superficiale Schicht.....	59
5	DISKUSSION	63
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	70
8	ANHANG.....	76
8.1	Lebenslauf.....	76
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung	77
8.3	Danksagung	78

1 Zusammenfassung

Intermediärfilamente stellen als Bestandteil des Zytoskeletts eine wichtige intrazelluläre Komponente jeder eukaryontischen Zellen dar.

Gemeinsam mit den Mikrofilamenten und Mikrotubuli sind Intermediärfilamente unter anderem von großer Bedeutung für die Kontrolle der Zellform, den intrazellulären Transport und für die lokomotorische Aktivität der Zelle und Organellen.

Für viele Jahre waren die Intermediärfilamente in Betracht auf ihre Funktion, Morphologie, Zusammensetzung und Dynamik die am wenigsten verstandene Komponente des Zytoskeletts. Durch Anwendung monoklonaler Antikörper und seit jüngster Zeit der konfokalen Mikroskopie sowie der 3D-Rekonstruktion vergrößert sich jedoch stets das Wissen über die Intermediärfilamente, die eine Superfamilie von Proteinen bilden, welche biochemische, immunologische und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen.

Auch ermöglichen diese Fortschritte die Zuordnung immer weiterer Proteine zu der Gruppe der Intermediärfilamente. Das chondrozyten-spezifische CH65 gehört zu den in jüngster Zeit entdeckten Intermediärfilamenten. Bisherige biochemische Untersuchungen brachten große Ähnlichkeiten zwischen CH65 und Vimentin in bovinen Chondrozyten ans Tageslicht, so dass das CH65 gleich dem Vimentin der Klasse III der Intermediärfilamente zugeordnet wird. Darüber hinaus zeigten Studien, dass CH65 funktionell in Krankheitsprozesse rheumatoider Arthritis involviert ist. Aufgrund der großen biochemischen Ähnlichkeit besteht die Frage der intrazellulären raumstrukturellen Kongruenz beider Filament-Spezies.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Netzwerkstrukturen von Vimentin und CH65 im bovinen Chondrozyten darzustellen und auf intrazelluläre raumstrukturelle Kollokalisierungen hin zu untersuchen.

Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit die immunhistochemische Untersuchung boviner Chondrozyten *in vitro* sowie in nativen Gewebepreparaten in den Mittelpunkt gestellt, wobei der Vergleich beider Intermediärfilamente primär mittels z-Stapel-Modus am ApoTome bzw. konfokalen Lasermikroskop erfolgte.

In vitro wie *in vivo* zeigte sich, dass sowohl Vimentin als auch CH65 im Chondrozyten jeweils ein intrazellulär dreidimensionales Netzwerk bilden, welches sich von der Zellmembran bis hin zur Zellkernmembran erstreckt und perinukleär besonders prominent erscheint.

Darüber hinaus stellte sich Vimentin als ein gut organisiertes Netzwerk dar, welches mit filigranen Strängen in vorwiegend zur Knorpeloberfläche parallel orientierter Ausbreitungsrichtung das Zytoplasma durchzieht. Die zytoplasmatische Raumarchitektur des CH65 hingegen wies ein eher gering organisiertes, granuläres Erscheinungsbild sowie einen vorrangig vertikalen Faserverlauf auf.

Somit konnte gezeigt werden, dass Vimentin und CH65 grundlegend sehr ähnliche Netzwerkstrukturen, jedoch keine identische intrazelluläre Raumarchitektur aufweisen.

Bekannt ist, dass bei Intermediärfilamenten eine Wechselbeziehung zwischen Netzwerkstruktur und Funktionalität besteht. Beide Netzwerke vergleichend scheint das CH65-Netzwerk mit seiner vorrangig granulären Grundstruktur eine geringere funktionale Suffizienz aufzuweisen als das des Vimentins.

Frühere Studien konnten dem CH65 bereits eine Beteiligung an der Pathogenese der rheumatischen Arthritis nachweisen. Aber auch das Vimentin hat in Bezug auf die Pathogenese der Rheumatoidarthritis an Aktualität gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass Citrullinierung von Proteinen offensichtlich einen kritischen Prozess in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis darstellt und dass citrulliniertes Vimentin dem für Rheumatoidarthritis hoch spezifischen Sa-Antigen entspricht.

Interessant ist, dass CH65 mit 65kDa das gleiche Molekulargewicht aufweist wie citrulliniertes Vimentin. Ferner ist bekannt, dass Citrullinierung von Vimentin zu einer Disassemblierung der Filamente führt. Auch das CH65 zeugt mit seinem granulären Signalmuster von einer Disassemblierung seiner Filamente.

Vor diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass CH65 citrulliniertem Vimentin entspricht und damit das für die rheumatoide Arthritis hoch spezifische Sa-Antigen repräsentiert. Chondrozyten exprimieren folglich citrulliniertes Vimentin als normale Variante, so dass assemblierte Vimentinfilamente neben disassemblierten in einem Gleichgewicht vorliegen.

Die vorliegende Arbeit konnte jedoch nur das strukturelle Fundament dieser Mutmaßungen legen, so dass fortführende Untersuchungen zur endgültigen Klärung der Identität des CH65 notwendig sind.

2 Einleitung

Lange Zeit waren Intermediärfilamente, die als intrazellulärer Bestandteil des Zytoskeletts eine wichtige Komponente jeder eukaryontischen Zelle darstellen, in Bezug auf ihre Zusammensetzung, Morphologie, Dynamik und Funktion wenig erforscht.

Doch seit nunmehr 30 Jahren macht die zytologische Forschung auf diesem Gebiet große Fortschritte. Durch Anwendung monoklonaler Antikörper und seit jüngerer Zeit der konfokalen Mikroskopie sowie der 3D-Rekonstruktion vergrößert sich fortwährend das Wissen über die Intermediärfilamente. Daneben ermöglichen diese Fortschritte die Zuordnung immer weiterer Proteine zu der Gruppe der Intermediärfilamente.

Auch das CH65 gehört zu den in neuerer Zeit entdeckten Intermediärfilamentproteinen. Isoliert aus bovinem Knorpel zeigt es biochemisch große Ähnlichkeiten zu dem Intermediärfilamentprotein Vimentin. Die Frage, ob CH65 und Vimentin identisch oder nur eng miteinander verwandt sind, ist dabei noch nicht restlos geklärt. So steht auch der Vergleich der Organisation beider Filamente noch ganz am Anfang.

2.1 *Knorpel/Gelenkknorpel*

Knorpelgewebe (*textus cartilagineus*) ist ein hoch spezialisiertes Bindegewebe mesenchymalen Ursprungs, welches gemeinsam mit dem Knochengewebe das Stützgerüst des menschlichen Körpers bildet.

Knorpel besteht grundsätzlich aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und extrazellulärer Matrix (EZM). Charakteristisch hierbei ist eine niedrige Zelldichte in einem hohen Gehalt an EZM sowie die fehlende Vaskularisierung, Innervation und das Fehlen von Lymphgefäßen. Demzufolge zählt Knorpelgewebe zu den bradytrophen Geweben, dessen Transport von Nährstoffen und Metaboliten ausschließlich durch passive Diffusion zwischen den Zellen und der Synovia erfolgt (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Die bedeutendsten Eigenschaften von Knorpelgewebe stellen die hohe Druckelastizität und die Fähigkeit große Druckkräfte bei minimalen Reibungsverlusten zu übertragen dar.

Gelenkknorpel, der im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen stehen soll, ist eine besonders funktionell hochwertige Form von hyalinem Knorpel.

Er kann in vier horizontale Abschnitte unterteilt werden, die sich durch unterschiedliche molekulare Zusammensetzung und Struktur der EZM (Mow und Hayes 1991), eine schichtentypische Zellanordnung und durch differenten Metabolismus der Chondrozyten voneinander abgrenzen lassen (Idowu et al. 2000). Im Allgemeinen werden eine superficiale (tangential) Zone von einer mittleren und tiefen Zone, sowie eine Tidemark und eine kalzifizierte Zone mit dem subchondralen Knochen voneinander unterschieden (s. Abb.1) (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Die oberflächliche Zone

Diese Zone entspricht etwa 10-20% der gesamten Knorpeldicke. Die feinen, einheitlichen Kollagenfasern dieser Schicht verlaufen tangential zur Gelenksoberfläche (Mow und Hayes 1991) und verleihen dem Knorpel durch ihre dicht gepackten Schichten die charakteristische „hyaline“ Trübung. Daneben weisen diese Fasern einen geringen Gehalt an Proteoglykanen auf (Palfrey und Davies 1966, Ghadially 1983, Poole 1997).

Die innerhalb dieser Zone liegenden Chondrozyten, welche weniger als 10% des Gesamtvolumens des Gelenkknorpels ausmachen, sind scheibenförmig abgeflacht und in bis zu drei Schichten übereinander angeordnet (Mollenhauer und Kuettner 1997). Mit ihrer Längsachse liegen sie parallel zur Oberfläche, von der sie nur durch eine sehr dünne Schicht EZM getrennt sind (Kuettner 1994). Durch die Produktion eigener spezifischer Bestandteile der extrazellulären Matrix (Aydelotte und Kuettner 1988, Aydelotte et al. 1988), vor allem eines spezifischen Proteoglykans (Schumacher et al. 1994), unterscheiden sie sich deutlich von Chondrozyten der anderen Zonen.

Ferner reagieren diese Knorpelzellen sehr empfindlich auf externe Reize und auch deutlich auf Interleukin-1 (Aydelotte et al. 1992, Hauselmann et al. 1996). Die Fähigkeit der Phagozytose (Cooke et al. 1983) und Antigenpräsentation (Jahn et al. 1986) sowie die Abgabe reaktiver Sauerstoffspezies und Eicosanoiden lässt diese Chondrozyten zudem funktionell wie Makrophagen erscheinen (Takagi und Jasin 1992, Hauselmann et al. 1994, Jasin 1995).

Da Gelenke nicht von einer Basalmembran umgeben sind, scheint es, als diene diese superficiale Schicht selbst als eine Art Basalmembran; mit der Funktion, den Knorpel

vom umgebenden Gewebe und Körperflüssigkeiten zu trennen (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Die mittlere Zone

Die Kollagenfasern dieser Zone, die 40-60% der Knorpeldicke ausmacht, haben einen größeren Durchmesser als die der oberflächlichen Schicht, erscheinen wie zufällig angeordnet und verlaufen in einer leicht diagonalen, sich überkreuzenden Anordnung zur Gelenksoberfläche (Mow und Hayes 1991). Durch diese Anordnung bilden die Kollagenfasern, die eine hohe Konzentration an Proteoglykanen enthalten (Palfrey und Davies 1966), ein Übergangsnetzwerk zwischen den oberflächlichen, tangentialen Fasern und den radial verlaufenden Fasern der tiefen Zone (Poole 1997).

Chondrozyten dieser Schicht erscheinen in runder bzw. kugelförmiger Gestalt (Poole 1997) und liegen wie zufällig verstreut in der EZM. Sie sind zudem von einer territorialen Matrix, Knorpelhöfe bildend, umschieden. Diese perizelluläre Matrix unterscheidet sich sowohl in ihren Eigenschaften als auch in ihrer Zusammensetzung von der interterritorialen Matrix (Schenk et al. 1986).

Gemeinsam mit den Zellen der tiefen Zone sind diese Chondrozyten metabolisch aktiver als die Zellen der superficialen Schicht (Marles et al. 1991). Sie stellen den Hauptfunktionsträger des Knorpels dar und produzieren alle Bestandteile der EZM: Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine, Hyaluronsäure sowie spaltende Enzyme, vor allem Metalloproteinasen (Kuettner 1992).

Je nach Lokalisation im Gelenk liegen die Chondrozyten dieser Schicht einzeln oder in isogenen Gruppen von zwei und mehr Zellen zusammen. Diese, auch Chondrone genannten isogenen Gruppen können als funktionelle Untereinheit innerhalb der EZM betrachtet werden (Poole et al. 1987, Poole et al. 1991). Äquivalent zu der territorialen Matrix einzelner Chondrozyten unterscheidet sich die EZM der Chondrone strukturell und funktionell von der interterritorialen Matrix.

Die tiefe Zone

In dieser Zone (30% der Knorpeldicke ausmachend) erscheinen die Kollagenfasern in senkrechter Ausrichtung miteinander verflochten. Die so gebildeten großen Faserbündel verlaufen durch die darunter gelegene Tidemark und inserieren in der kalzifizierten Zone (Mow und Hayes 1991).

Die Chondrozyten dieser Zone sind vor allem von ellipsoider Gestalt mit Längsachsen, die senkrecht zur Oberfläche zeigen. Zwei bis sechs Chondrozyten sind jeweils in senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Säulen angeordnet (Kuettner 1994).

Tidemark und kalzifizierte Zone

Die Tidemark ist ein etwa 10µm schmaler, zellfreier Bereich zwischen der tiefen und der kalzifizierten Zone, deren molekulare Zusammensetzung, ausgenommen einiger Ablagerungen angesammelter kalzium-enthaltender Mineralien, weitgehend unbekannt ist. Das Verhalten des Gewebes gegenüber einigen bestimmten Farbstoffen lässt jedoch eine erhöhte Konzentration von Glykoproteinen und extrazellulären Lipiden vermuten (Mollenhauer und Kuettner 1997). Auch lässt sich mit zunehmendem Alter eine Verschiebung der Tidemark Richtung Knorpeloberfläche beobachten (Oegma und Thompson 1986).

Die darunter liegende kalzifizierte Zone bildet ein Übergangsgewebe zum Knochen (Oegma und Thompson 1990) und dient dem Verhindern der Diffusion von Nährstoffen aus dem Knochen in den Knorpel. Die runden Chondrozyten dieser Schicht liegen innerhalb unkalzifizierter Lakunen in der kalzifizierten EZM (Poole 1997), dessen Kalziumgehalt geringer als der des Knochens ist (Mollenhauer und Kuettner 1997).

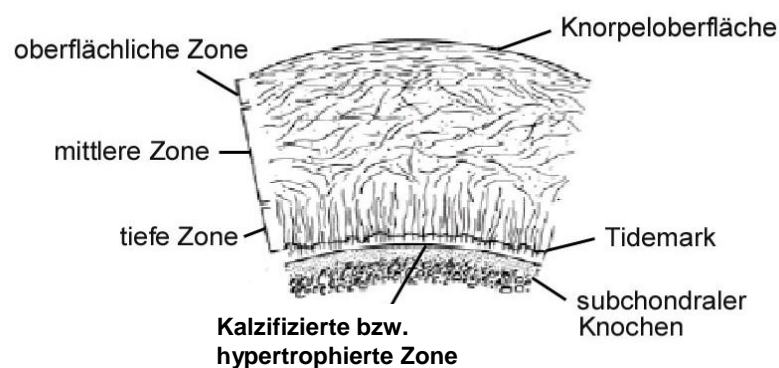


Abbildung 1: Darstellung der Zonen des hyalinen Knorpels (Mow und Hayes 1991)

2.1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix stellt eine aus mehreren Komponenten aufgebaute Struktureinheit dar, welche für die Stabilität und Elastizität des Gewebes verantwortlich ist.

Hauptbestandteile sind Wasser, Kollagene (v.a. Typ II), Proteoglykane, Glykoproteine, Glykosaminoglykane (z.B. Hyaluronsäure) und Ionen. Daneben spielen Matrix-Metallo-Proteinasen und ihre Inhibitoren, z.B. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases sowie Wachstumsfaktoren eine ausschlaggebende Rolle (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Die EZM des hyalinen Knorpels besteht zu 75% aus Wasser (Stockwell 1978) und kommt einem „Proteoglykan-Wasser-Gel“ gleich, in welches die kollagenen Fasern eingelagert sind. Proteoglykane sind in der Lage Wasser zu binden und bilden so die Grundlage für Elastizität, Druckresistenz und für den Austausch von Nährstoffen und Metaboliten. Die kollagenen Fasern hingegen verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit. Sie wirken dem Quellsdruck entgegen und erlauben nur rund 40 Prozent der maximalen Hydratation, so dass im Knorpel ständig die Tendenz zur Wasseraufnahme besteht (Mollenhauer und Kuettner 1997).

2.1.2 Der Chondrozyt

Die wenigen Zellen des Knorpelgewebes (< 20% des Gesamtvolumens) entstammen einer mesenchymalen Differenzierungslinie und sind für die Bildung, Organisation und den Erhalt der ausgedehnten EZM verantwortlich (Stockwell 1978). Demgemäß sind sie für den Erhalt der strukturellen als auch funktionellen Integrität des Gewebes von entscheidender Bedeutung (Idowu et al. 2000).

Schon die Vorläuferzellen der Chondrozyten, die noch teilungsfähigen Chondroblasten, beginnen mit der Synthese einer weichen Matrix, in der zelluläre Ortsverrückungen noch möglich sind (Drenckhahn und Hunziker 2003).

Im adulten Knorpel weisen die Chondrozyten (postmitotische Knorpelzellen) nur noch eine sehr geringe metabolische Aktivität auf. Zellproliferation ist kaum nachweisbar (Handley et al. 1986). Lokomotorische Aktivität ist aufgrund der nun versteiften und starken EZM aufgehoben (Benjamin et al. 1994).

Typischerweise sind Chondrozyten runde Zellen mit einem maximalen Durchmesser von 10µm (in Gelenknorpel) bis 30µm (in anderem hyalinen Knorpel) (Stockwell und Meachim 1973). Unreife Chondrozyten besitzen häufig noch ein Monozilium. Die Oberfläche von Knorpelzellen ist muschelförmig und vergrößert so ihr Verhältnis zum Volumen. Der Zellkern älterer Chondrozyten ist häufig von irregulärer gelappter Gestalt (Stockwell 1978).

Vorherrschende zytoplasmatische Organellen des Chondrozyten sind vor allem ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum sowie ein großer Golgi-Apparat (Stockwell 1978). Beide Elemente sind für die Synthese und Sekretion der Kollagene und Proteoglykane verantwortlich (Revell und Hay 1963, Horwitz und Dorfmann 1968, Ross 1975).

Ferner sind Zytoskelett-Komponenten ein wichtiger Bestandteil des Chondrozyten. Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente stabilisieren und stützen das Zytoplasma der Knorpelzelle und sind über spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche mit der EZM verbunden (von der Mark und Conrad 1979).

Adulte Chondrozyten gelten als terminal differenziert und nicht mehr teilungsfähig (Dustmann et al. 1974). Selbst nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren teilen sich adulte Chondrozyten im gesunden Gewebe nicht (Langelier et al. 2000).

Unter pathologischen Bedingungen hingegen können Knorpelzellen aktiviert werden. Durch *in vitro* Kultivierung werden massive Veränderungen der Morphologie und der funktionellen Aktivität sowie Dedifferenzierung der Chondrozyten beobachtet (Sokoloff 1980). Der Grad der Dedifferenzierung hängt dabei stark von den Kulturbedingungen ab (Solursh und Meier 1974). Geringe Zelldichten begünstigen die Dedifferenzierung, hohe Zelldichten erhalten indessen die Morphologie der Chondrozyten. Bei der Anzüchtung von Monolayern (durch Proliferation der Zellen konfluierende Schichten), die das Ausbreiten der Zellen erlauben, dedifferenzieren die isolierten, ursprünglich rundlichen Chondrozyten zu einem fibroblastoiden, polygonalen Phänotyp (Holtzer et al. 1960, Mayne et al. 1976, Benya et al. 1978).

Der chondrogene Phänotyp ist durch die Synthese von Typ II Kollagen und Aggrecan charakterisiert (von der Mark und Conrad 1979). Bei Dedifferenzierung kommt es zu einem Umschalten der Kollagensynthese zu Typ I sowie zu einer Down-Regulation der Aggrecan-Synthese und zur Ausbildung fokaler Kontakte und Stressfasern (von der Mark 1986, Watt und Dudhia 1988, Mallein-Gerin et al. 1991).

Bei Kultivierung isolierter Zellen innerhalb von Gelmatrices wie Agarose-Gelen behalten die Chondrozyten ihren chondrozytären Phänotyp bei und es kann weiterhin die Expression knorpelspezifischer Kollagene nachgewiesen werden (Benya und Shaffer 1982, Aydelotte et al. 1988, Aydelotte und Kuettner 1988).

Neben der Dedifferenzierung können kultivierte Chondrozyten aber auch in das Stadium der Hypertrophie eintreten (Bohme et al. 1995). Charakteristisch für hypertrophe Chondrozyten ist die Produktion von Typ X Kollagen und das Auftreten unspezifischer alkalischer Phosphataseaktivität (Bonen und Schmid 1991, Bohme et al. 1995). Physiologischerweise finden sich diese Zellen im fetalen Knorpel, wo sie als irreversibel postmitotische Zellen durch Apoptose absterben und durch Knochengewebe ersetzt werden (Roach et al. 1995).

2.2 Zytoskelett

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen stellt ein dreidimensionales Netzwerk bestehend aus Mikrofilamenten (Aktin), Mikrotubuli (Tubulin) und Intermediärfilamenten (Keratin, Desmin, Vimentin u.a.) dar und ist von großer Bedeutung für die Kontrolle der Zellform und für die Bewegung der Zelle und Organellen (Benjamin et al. 1994).

Darüber hinaus gibt es berechtigte Vermutungen, dass das Zytoskelett in die Zytogenese, in den Erhalt des Phänotyps, in die Zellteilung sowie in den intrazellulären Transport, in Adhäsion als auch in Sekretion und Endozytose, in die Zellantwort auf externe Einwirkungen und in die Regulation der zellulären Hypertrophie involviert ist (Ghadially 1983, Paukkonen und Helminen 1987, Eggli et al. 1988, Benya et al. 1988, Wang et al. 1993, Ingber et al. 1994, Guilak 1995, Durrant et al. 1999).

Aktin und Tubulin finden sich dabei in fast jeder eukaryontischen Zelle, wohingegen Intermediärfilamente eher gewebe- und zellspezifisch sind.

Morphologisch zeigen sich charakteristische Unterschiede zwischen den Zytoskelett-Komponenten. Während Aktin-Mikrofilamente vor allem an der Innenseite der Zellmembran vorherrschend sind, ziehen sich die Netzwerke von Tubulin als auch von Vimentin von der Kernhülle bis hin zur Zellmembran. Das Vimentin-Netzwerk erscheint dabei enger und feiner als das von Tubulin (Langelier et al. 2000). Die

verschiedenen Lokalisationen sind dabei in Einklang mit den jeweiligen spezifischen Aufgaben.

Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente formen eine kontinuierliche, dynamische Verbindung zwischen fast allen zellulären Strukturen (Janmey 1998) und sind in der Lage durch ihre Viscoelastizität die 3D-Architektur der Zelle zu verändern (Ingber 1993a). Die drei Komponenten kommen dabei nicht einfach nebeneinander vor, sondern interagieren spezifisch untereinander und bilden so eine „einzelne harmonische Einheit“ (Ingber 1993b). So deuten einige morphologische Studien mögliche Verbindungen zwischen Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten innerhalb des gesamten Zytoplasmas an (Schliwa und van Blerkom 1981). Es wird sogar vermutet, dass Mikrotubuli der Organisation der IFs dienen könnten (Idowu et al. 2000).

Im Weiteren ist die Anordnung der drei filamentösen Systeme sehr labil und reagiert sehr empfindlich auf Änderungen des Umgebungsmilieus (Arcangeletti et al. 1997). Dies hat zur Konsequenz, dass Veränderungen der Kulturbedingungen (z.B. durch Abweichungen der Substratzusammensetzung, der mechanischen Belastung, der Temperatur, des pH Wertes oder des osmotischen Drucks) die Dynamik und Architektur des Zytoskeletts artifiziell beeinflussen können (Arcangeletti et al. 1997, Baschong et al. 1999).

Bei Kultivierung ist das Zytoskelett daneben in der Lage, seine räumliche Ausrichtung an die Beschaffenheit des Untergrundes anzupassen.

2.2.1 Intermediärfilamente/Vimentin

Intermediärfilamente (IFs) stellen eine Superfamilie von Proteinen dar, die biochemische, immunologische und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Franke et al. 1978, Fuchs und Weber 1994).

Abgeleitet von ihrem Durchmesser (10nm) hebt ihre Bezeichnung den Umstand hervor, dass der Durchmesser der IFs zwischen denen der Aktinfilamente (6nm) und der Mikrotubuli (23nm) liegt.

Für viele Jahre waren die Intermediärfilamente in Betracht auf ihre Funktion, Morphologie, Zusammensetzung und Dynamik die am wenigsten verstandene Komponente des Zytoskeletts.

Sie finden sich in eukaryontischen Zellen und sind aus verschiedenen Polypeptid-Untereinheiten aufgebaut, von denen mittlerweile etwa 50 bekannt sind (Fuchs und Weber 1994). Die Expression der zytoplasmatischen und nukleären IF-Proteine ist dabei sowohl Gewebe- als auch Zelltyp spezifisch (Skalli und Goldman 1991).

Nach Lazarides (1980) wurden die IFs, basierend auf die Aminosäuren-Sequenz und Zelltypen, in fünf Gruppen aufgeteilt: (Zyto)Keratine, welche sich in Zellen epithelialen Ursprungs finden und die mit etwa 30 Proteinen die größte Gruppe darstellen, Desmin (gefunden in Muskelzellen), Vimentin (in Zellen mesenchymalen Ursprungs), GFAP (in Gliazellen) und Neurofilamente, gefunden in Neuronen (Lazarides 1980).

Neuerdings werden die IFs nach Sequenzhomologie und Expressionsmuster klassifiziert, da Intermediärfilamente keineswegs zelltypisch sein müssen (s. Tab. 1, Fuchs und Weber 1999). Allerdings erfasst auch diese Einteilung nicht alle Intermediärfilamentproteine. So werden neuer entdeckte Proteine wie Filensin, Phakinin, Restin, Tektin, Skelemin und Transitin aufgrund zu weniger Sequenzhomologien außerhalb der Klassifikation geführt (Parry und Steinert 1999).

<i>Klasse</i>	<i>Proteinkomponente</i>	<i>Vorkommen</i>	<i>Filamentzusammensetzung</i>
I. saure Keratine	Saure Keratine	Epithelien	obligate Heteropolymere aus Klasse I+II im Verhältnis 1:1
II. basische Keratine	Basische Keratine	Epithelien	
III. Desmin-Typ	GFAP Desmin Vimentin Peripherin	Gliazellen, Astrozyten Muskelzellen mesenchymale Zellen periphere Neurone	Homopolymere bzw. Heteropolymere mit Klasse III- Proteinen o. NF-L
IV. Neurofilamente	NF-L NF-M NF-A Nestin Internexin	Neurone Neurone Neurone neuroepitheliale Stammzellen embryonale Neurone	obligate Heteropolymere
			Homopolymere
V. Lamin-Typ	Lamin A Lamin B Lamin C	Zellkern	Heteropolymere

Tabelle 1: Systematik der Intermediärfilamente

Werden von einer Zelle verschiedene Typen von IF-Proteinen exprimiert, können sich diese in Abhängigkeit von ihrer Untereinheit zu einem einzigen Netzwerk zusammensetzen (Heteropolymere, z.B. Vimentin und Desmin) oder zwei separate (z.B. im Fall von Keratin und Vimentin) formen (Lazarides 1980, Traub 1995).

Über die spezifischen Funktionen der Intermediärfilamente ist wenig bekannt. Lazarides beschrieb 1980 die Intermediärfilamente als mechanische Integratoren innerhalb der Zelle, welche mechanische Ereignisse räumlich koordinieren (Lazarides 1980). Spätere Studien zeigten ergänzend, dass Vimentin-Intermediärfilamente mechanische Belastungen via β_1 -Integrine von der Zellmembran auf den Zellkern übertragen (Wang et al. 1993, Benjamin et al. 1994) und es durch Mechanotransduktion zu einer direkten Umwandlung einer Zelldeformierung zu einer Zellkerndeformierung kommt (Langelier et al. 2000). Daneben wird den Intermediärfilamenten eine Signal- und Transportfunktion zugeschrieben (Skalli und Goldman 1991, Langelier et al. 2000). So wird vermutet, dass das IF-Netzwerk ein gesteuertes Transportsystem für mRNA darstellt (Skalli und Goldman 1991).

Weitere Studien zeigten, dass Zellen wie Chondrozyten in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung ihren Gehalt an Intermediärfilamenten über Zusammenbau und Abbau variieren können (Durrant et al. 1999). Zellen in gewichttragenden Regionen des Gelenkknorpels weisen einen höheren Gehalt an IFs auf als in nicht-gewichttragenden Zonen (Eggli et al. 1988).

Zudem gibt es die Vermutungen, dass Intermediärfilamente durch den Verlust ihrer Expression eine Rolle in der Entwicklung von Osteoarthritis (OA) spielen (Benjamin et al. 1995, Capin-Gutierrez et al. 2004). Kontrovers dazu wiesen andere Untersuchungen ein vermehrtes Vorkommen von Intermediärfilamenten in OA-Knorpel nach (Ghadially 1983). Möglicherweise als Folge der reduzierten mechanischen Integrität der EZM und der daraufhin steigenden Belastung auf die Zellen.

Verallgemeinert betrachtet bestehen alle IFs aus Proteinen, die eine gemeinsame Sequenz und strukturelle Charakteristika teilen. Alle IF-Proteine bestehen aus einer zentralen, stark konservierten α -helikalen Stabdomäne (rod domain), welche von einer nicht-helikalen Kopf- (Amino-Ende; head domain) und Schwanzdomäne (Carboxyl-Ende; tail domain) flankiert ist (Parry und Steinert 1992). Die Stäbe zweier Monomere

greifen in einer coiled-coil Form ineinander und bilden so Dimere, welche sich in einer antiparallelen Orientierung zu Tetrameren zusammensetzen (Geisler und Weber 1982). Diese bilden den Grundbaustein der Protofilamente. Durch laterale Assoziation zweier Protofilamente entsteht eine Protofibrille. Ein 10nm Filament wird von vier seitlich aneinander gelagerten Protofibrillen gebildet und besteht infolgedessen aus mehreren 10.000 individuellen Polypeptid-Ketten (s. Abb. 2). Über IF-assoziierte Proteine (IFAPs) wie Ankyrin, Plektin und Desmoplakin können sich Intermediärfilamente zu größeren Bündeln, sog. Tonofilamenten vereinigen (Fuchs und Weber 1994) und sind so für die zytoplasmatische Organisation der IFs mitverantwortlich (Skalli und Goldman 1991).

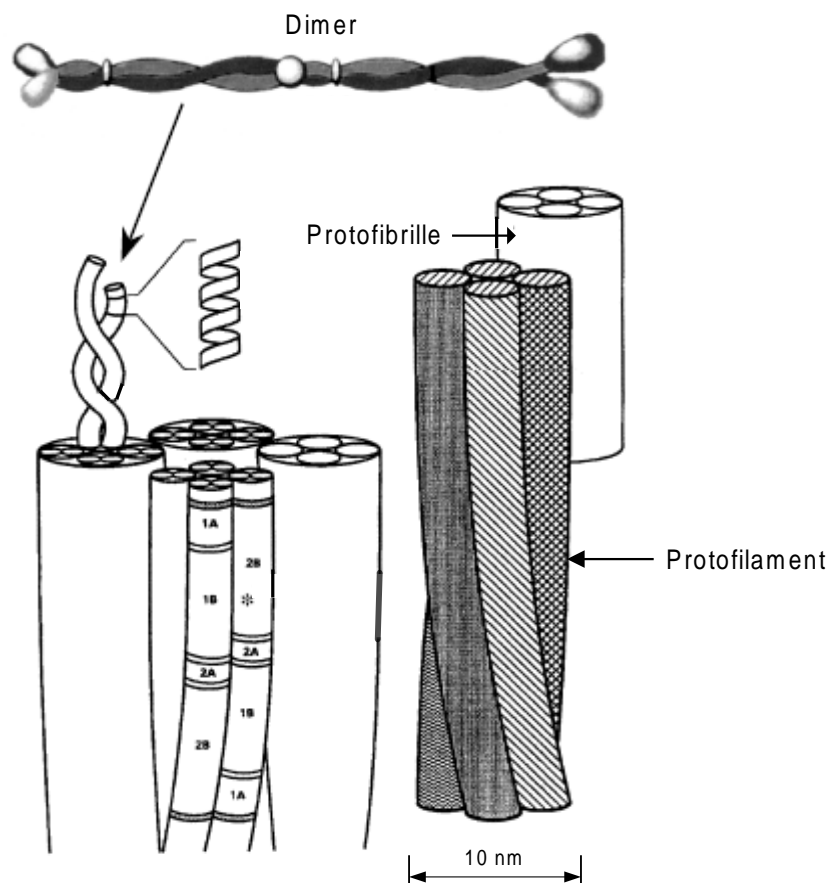


Abbildung 2: Sekundärstruktur der Intermediärfilamente (aus Parry und Steinert 1999)

Die Heterogenität der Intermediärfilamente wird vorwiegend durch die Struktur der Kopf- und Schwanzdomäne bedingt. Diese variieren typspezifisch in Länge, Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur und liegen im Filament an der Oberfläche, so dass sie leicht mit anderen IFs oder IFAPs interagieren können (Parry und Steinert 1992) und infolgedessen für gewebsspezifische Funktionen der unterschiedlichen Intermediärfilamentproteine verantwortlich sind.

Des Weiteren zeigten *in vitro* und *in vivo* Experimente, dass die Kopfdomäne von entscheidender Bedeutung für den Zusammenbau der Filamente ist, wohingegen der C-terminale Schwanz eher an der allgemeinen Organisation des IF-Netzwerkes beteiligt ist (Fuchs und Weber 1994).

Zusätzlich wird der Zusammenbau der IF-Proteine durch Phosphorylierung moduliert und so die Organisation des IF Netzwerkes reguliert (Skalli et al. 1992). Polymerisierte IFs sind dabei immer im dynamischen Gleichgewicht mit unpolymersierten Untereinheiten (Benjamin et al. 1994).

IFs formen ein dynamisches, aber stabiles drei-dimensionales Netzwerk, welches die Zelle von der Kernhülle bis zur Zellmembran durchspannt (Lazarides 1980) und vorzugsweise um den Zellkern herum angeordnet ist (Baschong et al. 1999).

Es scheint, als seien die IFs am Zellkern direkt an der Hülle oder an den Porenkomplexen befestigt (Skalli und Goldman 1991), während ihre Verbindung zur Zellmembran über Membran-assoziierte Proteine (IFAPs) zustande kommt (Fuchs und Weber 1994).

Diese typische Anordnung des zytoplasmatischen Netzwerkes verändert sich während des Durchlaufens der Mitose, bei der sich die Fasern um den Spindelapparat herum anlagern (Franke et al. 1978), oder durch pathologische und experimentelle Bedingungen (Skalli et al. 1992). So weicht dieser charakteristische Aufbau bei der sich ausweitenden Zelle (z.B. durch Dedifferenzierung) einer Zerstreuung der Intermediärfilamente im Zytoplasma (Lazarides 1980)

Ferner kann auch die Expression eines Proteintyps durch abweichende Bedingungen verändert werden (Traub 1985).

Im Chondrozyten wurden verschiedene Typen der IFs gefunden. Linss wies als erster Vimentin (lat. *vimentum* Flechtwerk) im Gelenkknorpel nach (Linss et al. 1986), während andere Studien das Vorhandensein von GFAP und Zytokeratinen belegen (Benjamin et al. 1994).

Die IFs der Knorpelzelle sind oft in dichten Windungen angehäuft und nehmen einen großen Teil des Zytoplasmas ein. Auch sind sie, wie auch bei anderen Zelltypen, häufig mit Lipidtropfen assoziiert (Sprinz und Stockwell 1976).

Vimentin bildet im Chondrozyten ein typisches dreidimensionales Netz von Strängen aus, welches sich vom Zellkern bis hin zu den Zellausläufern erstreckt. Gleich dem perinukleären Ring werden auch Vakuolen von Vimentin umschlossen (Linss et al. 1986).

Die räumliche Massenverteilung von Vimentin im Chondrozyten variiert je nach Lokalisation und zeigt dabei das größten Ausmaß perineukleär (Linss et al. 1986). Auch innerhalb des Gelenkknorpels zeigt sich ein zonal abhängiger heterogener Gehalt an Vimentin. Dabei beschreiben einige Studien eine höhere Menge Vimentin in der superficialen Schicht verglichen mit den tieferen Zonen (Langelier et al. 2000). Andere Studien hingegen zeigten, dass Vimentin vor allem in der mittleren und tiefen Schicht des Knorpels markant angereichert sei (Palfrey und Davies 1966, Ghadially 1983, Paukkonen und Helminen 1987, Benjamin et al. 1994, Durrant et al. 1999).

Daneben verändert sich je nach zonaler Lokalisation auch das räumliche Verteilungsmuster von Vimentin innerhalb der Zelle. Das Vimentin-Netzwerk von Chondrozyten der superficialen Schicht erscheint als leicht gebogene Bündel, die gleichmäßig im Zytoplasma verteilt sind. Hingegen liegt das Vimentin-Netzwerk in den Chondrozyten der tiefen Zone vor allem dicht gepackt um den Zellkern herum vor (Casey 1998).

Neben der zonalen Heterogenität zeigt sich eine belastungsabhängige. So wird in gewichttragenden Regionen in der Regel mehr Vimentin exprimiert als in nicht-gewichttragenden Knorpelabschnitten (Eggli et al. 1988).

2.2.2 CH65

CH65 ist ein chondrozyten-spezifisches Membran-Protein des Molekulargewichtes von 65kDa.

Zuerst aus Hühnerknorpel isoliert, schien es aufgrund von Übereinstimmungen in der Aminosäuren-Sequenz zu den Intermediärfilamenten, insbesondere zu den (Zyto)Keratinen, zu gehören. Immunologische Crossreaktionen zu den Zytokeratinen fanden sich nicht (Bang et al. 1994).

Fortführende Untersuchungen haben diese Zugehörigkeit zudem durch das Fehlen von Glykosylierung und der Lokalisation im Zytoplasma bestärkt. Im Weiteren zeigten Aminosäuren-Sequenzierung, Peptid-Kartierung und immunologische Crossreaktion, dass das Autoantigen im Rinderknorpel mehr Ähnlichkeit zu Vimentin als zu den Zytokeratinen aufweist (Casey 1998). Auch in anderen Geweben mesenchymalen Ursprungs konnte CH65 nachgewiesen werden, so dass vermutet wird, dass mit CH65 ein neues Intermediärfilament der Klasse III gefunden wurde, welches eng verwandt, aber nicht identisch mit Vimentin ist.

Die Funktion von CH65 ist bis dato kaum erforscht, aber es scheint, als sei CH65 in die Krankheitsprozesse von rheumatoider Arthritis involviert (Feige et al. 1994).

Strukturell setzt sich CH65 aus einem Minimum von vier 65kDa Untereinheiten zu einem Oligomer zusammen.

Ähnlich Vimentin weist auch CH65 im bovinen Knorpelgewebe eine zonal unterschiedliche Expression auf. In der mittleren und tiefen Zone ist CH65 mittels indirekter Immunfluoreszenz darstellbar, in den obersten Schichten der superficialen Zone hingegen nicht. Anders als Vimentin ist CH65 dabei nicht nur intrazellulär nachweisbar, sondern auch an der äußeren Oberfläche der Zellmembran (Casey 1998).

2.3 Zielstellung

Intermediärfilamente stellen eine immer größer werdende Superfamilie von Proteinen dar, die sowohl biochemische, immunologische als auch strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Während Vimentin schon lange den Intermediärfilamenten der Klasse III zugeordnet werden kann, gehört das CH65 zu den jüngst entdeckten Intermediärfilamenten. Biochemische Untersuchungen des CH65 konnten darüber hinaus große Ähnlichkeiten zu Vimentin in bovinen Chondrozyten nachweisen.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war der immunhistochemische Vergleich der intrazellulären Raumarchitektur von Vimentin und CH65 in bovinen Chondrozyten basierend auf der Frage, ob Vimentin und CH65 kolokalisierte Netzwerkstrukturen aufweisen.

Daraus resultierend ergaben sich folgende Teilaufgaben bzw. Ziele:

1. Immunhistochemische Einzeldarstellungen von CH65 und Vimentin an isolierten, kultivierten Chondrozyten verschiedenen Phänotyps (rundlich, pflastersteinartig und polygonal, fibroblastoid),
2. Immunhistochemische Doppeldarstellungen von CH65 und Vimentin an isolierten, kultivierten Chondrozyten verschiedenen Phänotyps sowie an Schnitten nativer Gewebepräparate,
3. Vergleichende Doppelfärbungen von CH65 und Vimentin an isolierten, kultivierten Fibroblasten aufgrund der Dedifferenzierung kultivierter Chondrozyten zu einem fibroblastoiden Phänotyp.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alexa Fluor 488 Anti-Mouse-IgG	Molecular Probes, Eugene (USA)
Alexa Fluor 594 Anti-Mouse-IgG	Molecular Probes, Eugene (USA)
Antifade reagent, P7481 Component A, Lot:02E5-1,	Molecular Probes, Eugene (USA)
Anti Mouse IgG from Goat, M5899	Sigma, Steinheim
Albumin Fraktion V (aus Rinderserum, BSA)	E. Merck, Darmstadt
Canada-Balsam®	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
DAPI	Roche, Mannheim
DMEM-F12 HAM	Sigma, Steinheim
Eosin	Chroma GmbH & Co.
Essigsäure	E. Merck, Darmstadt
Ethanol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
F2-AK	Von Herrn PD Dr. Mollenhauer zur Verfügung gestellt
Fetales Kälberserum (Kat. Nr. 40Q401K)	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma, Steinheim
Hämatoxylin n. Gill	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Kollagenase P	Roche, Mannheim
Lysin	E. Merck, Darmstadt
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, Code Nr. M 0725, LOT 057,	DAKO, Glostrup (Dänemark)
Natriumchlorid	E. Merck, Darmstadt

Natriumhydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	E. Merck, Darmstadt
Perjodsäure	E. Merck, Darmstadt
ProLong [®] Antifade-Kit	Molecular Probes, Eugene (USA)
Pronase E	E. Merck, Darmstadt
Sodiumbicarbonat	E. Merck, Darmstadt
Sucrose	E. Merck, Darmstadt
Tissue Tek [®]	O.C.T. [™] Compound
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	E. Merck, Darmstadt
Triton-X 100	E. Merck, Darmstadt
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

3.1.2 Pufferlösungen

3% Albumin-Tris	0,25g Albumin Fraktion V 8,3ml TBS
PBS	137mM Natriumchlorid 10,1mM Natriumhydrogenphosphat 2,7mM Kaliumchlorid 2,4mM Kaliumdihydrogenphosphat in Reinstwasser lösen und mit 5 N Natriumhydroxid auf pH 7,4 einstellen, Endvolumen: 1l
TBS	60 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 90 g Natriumchlorid mit HCl auf pH 7,5 einstellen

3.1.3 Fixierungen

4% PFA	4g Paraformaldehyd in 100ml PBS (pH 7,4)
2%PLP	50ml TBS 0,23g Perjodsäure 1,2g Lysin 0,65g Na ₂ HPO ₄ 50ml 4% PFA (pH 7,4)

3.1.4 Nährmedien und Zusätze

DMEM-F12 HAM	12g Trockenpulver + 1,2g Sodiumbicarbonat in 1l Reinstwasser lösen, Zugabe Gentamycin (50µl/ml) steril filtrieren
FCS	hitzeinaktiviert
FCS-Medium (Chondrocyten)	DMEM-F12 HAM + 5% FCS
FCS-Medium (Fibroblasten)	DMEM-F12 HAM + 20% FCS
Kollagenase-Lösung	0,1mg/ml Kollagenase P serumhaltiges DMEM-F12 Steril filtrieren
Pronase-Lösung	1mg/ml Pronase E serumfreies DMEM-F12 steril filtrieren

3.1.5 Immunhistologie

Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, Code Nr. M 0725, LOT 057	1:50 in PBS, 3%igem Albumin Tris und 0,1% Triton X-100
F2-Ak	1:100 in PBS, 3%igem Albumin Tris und 0,1% Triton X-100
Alexa Fluor 488 Anti-Mouse-IgG	1:100 in PBS, 3%igem Albumin Tris und 0,1% Triton X-100
Alexa Fluor 594 Anti-Mouse-IgG	1:200 in PBS, 3%igem Albumin Tris und 0,1% Triton X-100
Anti Mouse IgG from Goat, M5899	1:20 in TBS

3.1.6 Laborgeräte

Analysenwaage Sartorius BP 121S	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Kern GS 4100/2	TECHLAB, Erkerode
Apotom	Carl Zeiss, Jena
Brutschrank	kelvitron [®] t Heraeus-INSTRUMENTS
Brutschrank, NCO2	MEMMERT, Schwabach
Digitalkamera AxioCam	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Gefriertruhe (-80°C)	Nunc, Wiesbaden
Histokinette	Strandon Citodel 1000, Frankfurt
Kühlplatte EG 1130	Leica, Nussloch
Kryostat CM 1100	Leica, Nussloch
Löffel/Spatel aus Edelstahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magentrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Microflow Laminar Flow	Nunc, Wiesbaden

Workstation	
Mikrotom HM 355	Microm, Walldorf
Mikrowelle	Daewoo, Butzbad
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte Leica EG 1120	Leica, München
pH-Meter HI 8014	HANNA instruments, Kehl am Rhein
Pipetus [®] standard	Hirschmann
Pumpe (für Mediumzubereitung)	Millipore, Eschborn
Reinstwassersystem TKA-LAB Typ HP 6	TKA, Niederelbert
Vortexer Vortex-Genie 2 [®]	Scientific Industries
Wasserbad	MEMMERT, Schwabach
Zentrifugen 5810 R, mini spin	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

3.1.7 Glaswaren

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Roth
Glasgefäße	Schott Jena

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel GmbH und Co.KG, Braunschweig
Einmal-Handschuhe	Danz GmbH, Wetter
Einmal-Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Greiner-Schale	Greiner, Nürtingen
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel GmbH und Co.KG, Braunschweig
Paraffin	Paraplast Plus, Merck
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sterilfilter (0,2µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Stickstoff, flüssig	Linde AG, Höllriegelskreuth

Trockeneis	Chemiewerke, Leuna
------------	--------------------

3.1.9 Computersoftware

Adobe Reader 7.0	Adobe (Deutschland, München)
Adobe Photoshop	Adobe (Deutschland, München)
Axio Vision LE Rel. 4.4	Carl Zeiss, Jena
EndNote 6	Thomson ISI Research Soft, Philadelphia
LSM Image Browser	Carl Zeiss, Jena
Microsoft Office	Microsoft (Deutschland, Unterschleißheim)
Photoshop	Adobe (Deutschland, München)
Windows XP	Microsoft (Deutschland, München)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Gewinnung von Gelenksknorpel

Materialgrundlage dieser Arbeit stellte boviner Knorpel, gewonnen von Femurkondylen junger gesunder Rinder, dar.

Für einen bestmöglichen Erhalt der Gewebestruktur erfolgte unverzüglich nach Erhalt des Rinderknies die Knorpelentnahme. Unter sterilen Bedingungen und nach horizontaler Eröffnung des Gelenkspaltes wurde mittels Skalpell Knorpel der gesamten Knorpeldicke bzw. der superficialen Schicht abgeschält. Die Randzonen der Femurkondylen wurden ausgespart, um ein Fibroblasten freies Präparat zu gewähren. Im Anschluss wurden die so gewonnen Knorpelstücke entweder der Kultivierung überführt oder als *in vivo* Präparate weiterverarbeitet.

Bei folgender Kultivierung wurde zusätzlich das Gewicht des gewonnen Knorpels bestimmt, um eine Prognose der zu erwartenden Chondrozyten-Zahl treffen zu können. Hierfür ging man von 10 Millionen Chondrozyten pro 1g Knorpelmasse aus.

3.2.1.2 Kultivierung von Knorpelzellen

Vorraussetzung für die Anfertigung von Knorpelzellkulturen ist die Vereinzelung von Chondrozyten aus dem Knorpelgewebsverband.

Hierzu wurden die Knorpelstücke sequentiell enzymatisch verdaut, adaptiert an Aydelotte und Kuettner (1988). Zerkleinert und in ein Verdaugefäß überführt, erfolgte der erste Verdauschritt mit Pronase (1mg/ml) in serumfreiem DMEM-F12 für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte ein zweiter Verdauschritt mit bakterieller Kollagenase P (0,1mg/ml) in serumhaltigem Medium für 17 Stunden bei ständiger Agitation mittels Magnetrührer (im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit).

Danach wurden unverdaute Gewebsreste durch einen 100µm Sterilfilter entfernt. Der Verdau wurde in einem 50ml Falcon 5min bei 1500rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit PBS gewaschen. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit serumhaltigem

Medium resuspendiert. Dabei richtete sich die Menge des hinzugefügten Mediums nach der Größe des Pellets.

Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde nun die Zellzahl in der Verdünnung gezählt:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times 5000 \times \text{Verdünnung} = \text{Gesamtzahl}$$

Ausgesät auf Objektträgern in einer Zelldichte von je einer Million Chondrozyten wurden diese in Greiner-Schalen in den Brutschrank gegeben. Nach einer Adhärenzzeit von etwa 3 Stunden wurden die Greiner-Schalen mit serumhaltigem Medium aufgefüllt. Die Dauer der Kultivierung richtete sich nach der gewünschten Morphologie der Knorpelzellen. Für den Erhalt von Chondrozyten ursprünglichen chondrozytären Phänotyps erfolgte die Kultivierung zwei Tage lang, für einen polygonalen, fibroblastoiden Phänotyp wurde im Schnitt eine Woche lang kultiviert, bis Wachstum und Bewegung der primären Chondrozyten durch Kontakthemmung aufgehört hatten und ein Monolayer entstanden war.

Das Medium wurde bei Bedarf, gekennzeichnet durch einen Farbumschlag des Mediums, gewechselt.

3.2.1.3 Gewinnung und Kultivierung von Fibroblasten

Die Gewinnung der Fibroblasten zum Anlegen einer Primärkultur erfolgte in einem gemeinsamen Arbeitsschritt mit der Entnahme des Knorpels.

Unter sterilen Bedingungen wurde mittels Skalpell und Pinzette Synovialgewebe der Membrana synovialis aus dem eröffneten Kniegelenksspalt entnommen und in eine mit sterilem Medium gefüllte Greiner-Schale gebracht. Synoviabröckel wurden weiter zerkleinert auf sterilisierte SuperFrost Plus[®] Objektträger überführt, diese in Greiner-Schalen gegeben und mit einem Tropfen serumhaltigen (20% FCS) Medium benetzt. Nach einer Adhärenzzeit von 3 Stunden im Brutschrank wurden die Greiner-Schalen mit serumhaltigem Medium aufgefüllt und für ca. 3 Wochen kultiviert.

Der Wechsel des Mediums erfolgte auch hier nach Bedarf.

3.2.2 Histologische Methoden

3.2.2.1 Anfertigung von Kryostat-Schnitten

Die für diese Technik vorgesehenen Knorpelstücke wurden unmittelbar nach der Entnahme in Tissue-Tek[®] eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -21°C gelagert. Mittels Kryostat wurden bei einer Temperatur von -28°C Gewebepräparate einer Schnittdicke von 20µm angefertigt und auf SuperFrost Plus[®] Objektträger gebracht. Die gewählte Schnittdicke gewährleistete die Erfassung einer ausreichenden Menge von Chondrozyten in ihrer Gänze.

Die räumliche Ausrichtung der zu schneidenden Knorpelstücke richtete sich dabei nach der gewünschten Darstellungsweise des Gewebes. Zur Darstellung der superfiziellen Knorpelschicht erfolgte das Schneiden bei horizontaler Schneiderichtung des Knorpelstückes, zur Darstellung aller Schichten dagegen bei vertikaler Ausrichtung. Vor der Fixierung und Färbung erfolgte über Nacht die Lufttrocknung der Schnitte bei Raumtemperatur.

3.2.2.2 Anfertigung von Paraffin-Schnitten

Als zweite Variante der Gewebepräparation wurde die Paraffineinbettung angewandt. Hierfür wurden die zuvor gewonnenen und bereits fixierten Knorpelstücke (siehe unten) dreimal für je 2 Stunden mit PBS gewaschen und anschließend in Paraffin eingebettet. Dieser Prozess geschah maschinell innerhalb von 18 Stunden, in denen die Knorpelstücke abwechselnd in Ethanol (zur Entwässerung), Ethanol/Xylol, Xylol (zur Entfernung des Alkohols) und Paraffin inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Durchtränkung mit Paraffin bei +60°C und das Gießen von Paraffin-Blöcken. Die Knorpelstücke wurden dazu in gewünschter, vertikaler oder horizontaler Ausrichtung eingebracht. Vor der weiteren Verarbeitung folgte das Aushärten des Paraffins durch Lagerung bei -21°C für mindestens 30 Minuten.

Die Schnitte wurden mittels Microtom in den Schnittdicken 6µm und 20µm angefertigt, auf SuperFrost Plus[®] Objektträger gebracht und für eine halbe Stunde in einen +60°C Brutschrank gegeben.

Im Weiteren erfolgte das Entparaffinieren der Präparate. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte zweimal (30min + 20min) in Xylol und anschließend für je 15min in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 96%, 70%, 50%) gewaschen. Nach einem

kurzen Eintauchen in destilliertes Wasser waren die Schnitte färbebereit. Für Übersichtsdarstellungen der Chondrozyten folgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, für die Darstellung der IF-Netzwerke schlossen sich immunhistologische Färbungen an. Aufgrund der schlechten Paraffingängigkeit von monoklonalen Antikörpern wurde diese Methode zugunsten der Kryokonservierung jedoch wieder verlassen.

3.2.2.3 Fixierung

Da die richtige Fixierung für den morphologischen Erhalt der Chondrozyten und damit für eine möglichst lebensgetreue Darstellung des Zytoskeletts eine entscheidende Rolle spielt, wurde eine optimierte Fixierungslösung ermittelt.

Es wurden Fixierungen der Präparate mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und 2% PLP getestet.

Angeregt durch eine jüngste Studie über diverse Fixierungsmethoden zur optimalen Darstellung des Zytoskeletts von kultivierten Chondrozyten wurde zudem die Wirksamkeit der zusätzlichen Beigabe von 1% Glutaraldehyd geprüft (Blanc et al. 2005).

Da Knorpelgewebe durch seinen hohen Wassergehalt bei der Fixierung anfällig für Schrumpfungsveränderungen ist, wurde der Fixierungslösung Sucrose in unterschiedlicher Konzentration beigefügt (0,05M, 0,1M, 0,25M, 0,5M).

Der Permeabilisierungsprozess wurde durch Zusatz von 0,1% Triton X-100 in das Fixationsgemisch optimiert.

Die beste Strukturhaltung von intaktem Knorpelgewebe bei geringster unspezifischer Hintergrundfärbung wurde bei den *in vivo* Präparaten durch Fixation mit 4% PFA, 0,5M Sucrose und 0,1% Triton X-100 erreicht. Kultivierte Chondrozyten wurden dagegen mit 4% PFA und 0,1% Triton X-100 fixiert.

Die Fixationszeit richtete sich nach der Dicke der Präparate. Monolayer, Fibroblastenkulturen und Kryostatschnitte wurden 25min bei 20°C fixiert. Superfizielle Knorpelstücke und für die Paraffinierung vorgesehene Knorpelstücke mussten sofort nach der Entnahme über Nacht fixiert werden.

3.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um die bedeutendste Übersichtsfärbung in der Histologie.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand HE-gefärbter Schnitte der Gewebserhalt geprüft.

Die fixierten Gewebeschnitte wurden zunächst kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend für 10 Minuten in Hämatoxylin inkubiert. Es folgte die Farbentwicklung, das „Bläuen“, der Gewebepräparate in lauwarmem Leitungswasser für 5-10 Minuten und das zehnminütige Färben mit Eosin. Zur Entfernung überschüssigen Eosin-Farbstoffes wurde nochmals gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 96%, 100%, 100%) entwässert und unter Xylol in Canada-Balsam[®] eingedeckt.

3.2.3 Immunhistologische Methoden

Für die hochspezifische Darstellung des Vimentin und CH65 fand das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz Anwendung.

Dabei bindet ein spezifischer, nicht-fluochromierter mono- oder polyklonaler Primärantikörper an ein Epitop des nachzuweisenden Antigens. Ein, in einem zweiten Schritt aufgetragener, mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Sekundär-Antikörper bindet wiederum hochselektiv an den Erst-Antikörper und visualisiert dadurch indirekt das Antigen.

Im Gegensatz dazu steht die direkte Methode der Immunfluoreszenz, die in dieser Arbeit der Darstellung des Kernes bzw. der Kern-DNA diente. Hier wird das Antigen durch einen fluochromierten Primär-Antikörper nachgewiesen.

3.2.3.1 Vimentin

Für die Darstellung des Intermediärfilaments Vimentin wurden sowohl die Chondrozyten-Monolayer als auch die Gewebepräparate (Kryostat- und Paraffinschnitte) und kultivierten Fibroblasten verwendet.

Nach vorausgegangener Fixierung erfolgte das kurze Eintauchen in destilliertes Wasser sowie ein 15-minütiges Anfeuchten mit PBS. Anschließend wurde der

monoklonale Vimentin-Antikörper (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Clone V9, DAKO) aufgetragen (1:50 in PBS, 3%igem Albumin Tris und 0,1% Triton X-100).

Höhere AK-Verdünnungen 1:100 bis 1:1000 erbrachten ungünstigere Resultate.

Nach Inkubation über Nacht in der Feuchtekammer bei 4°C wurden die Präparate 5x für je 5min mit PBS gewaschen und mit dem Sekundär-Antikörper (Alexa Fluor 594 anti-mouse-IgG, Molecular Probes, Eugene (USA)) in einer Verdünnung von 1:200 für 2-3 Stunden beschichtet. Danach erfolgte wieder gründliches Waschen in PBS (3x 5min) und in destilliertem Wasser (2x 5min). Nachfolgend wurde entweder nach Zellkerndarstellung oder unmittelbar eingedeckt, welches nach kurzer Trocknung der Präparate auf einer Wärmeplatte und Auftragen von Anti-Fade-Kit erfolgte.

Nach einer Phase des Trocknens konnten die Präparate am Folgetag unter dem Mikroskop betrachtet und beurteilt werden.

3.2.3.2 Darstellung des CH65

Die Durchführung der immunhistochemischen Darstellung des CH65 glich der Vimentin-Färbung. Jedoch wurde der F2-Antikörper in der Verdünnung 1:100 verwendet und als Sekundär-Antikörper diente Alexa Fluor 488 anti-mouse-IgG (Molecular Probes, Eugene (USA)), verdünnt 1:100.

3.2.3.3 Doppelfärbungen

Die Doppelfärbungen dienten der gemeinsamen Darstellung der Vimentin- und F2-Gerüste des Chondrozyten und stellten die vorrangige Methode dieser Arbeit dar.

Die Durchführung dieser Methode setzte sich aus den Einzelfärbungen von Vimentin und F2 zusammen, getrennt durch ein Blocking zur Sättigung freier Valenzen des ersten Sekundärantikörpers.

Nach abgeschlossener Färbeprozedur des ersten Proteins folgte das gründliches Waschen (5x 5min) in PBS. Die Blocking-Substanz wurde in der Verdünnung 1:20 (in TBS) aufgebracht und im Dunklen für 30min belassen. Vor Aufbringen des zweiten Primärantikörpers wurden die Präparate erneut sorgfältig (10x 5min) gewaschen.

Die Reihenfolge von Vimentin und F2 wurde dabei variiert.

3.2.3.4 Zellkern-Darstellung / DNA-Färbung

Das Färben des Nucleus bzw. der Kern-DNA folgte im Anschluss an die immunhistochemische Färbung von Vimentin und F2.

Für die Darstellung des Zellkernes fand DAPI Anwendung.

Hierfür wurde im Anschluss an den letzten Waschgang (3x PBS je 5min, 2x Aqua dest. je 5min) der Kernfarbstoff, verdünnt 1:20.000 in destilliertem Wasser, aufgetragen und 5min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch sorgfältiges Waschen (2x Aqua dest. je 5min) entfernt und das Präparat eingedeckt.

Für die Darstellung der Kern-DNA fanden verschiedene Farbstoffe (Hoechst 34580 sowie zwei von Prof. Dr. Halbhuber zur Verfügung gestellte Farbstoffe) laut Protokoll Anwendung:

Hoechst 34580

→ Verdünnung: 1µl in 1ml PBS

→ Inkubation: 15min bei RT

→ Waschen mit Aqua dest.

Farbstoffe (Nr. 11/23) von Prof. Dr. Halbhuber

→ Verdünnung: 1µl in 1ml PBS

→ Inkubation: 30min

→ Waschen mit Aqua dest.

3.2.4 Auswertung und Dokumentation

In Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der orthopädischen Abteilung des Rudolf-Elle-Krankenhauses, Eisenberg erfolgte die Betrachtung und Dokumentation der Präparate an einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit integriertem ApoTome (Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung eines 100x/1.25 Öl-Objektivs.

Die Technik des ApoTome basiert auf dem Prinzip der „Gitterprojektion“, auch „strukturierte Beleuchtung“ genannt. Eine definierte Gitterkonstante wird in die Fokusebene des Projekts projiziert und in drei definierten Schritten lateral in der Probe bewegt (s. Abb. 3). Mittels CCD-Kamera wird an jeder dieser drei Gitterpositionen ein Bild aufgenommen und diese zu einem Ergebnisbild verrechnet. Es resultiert ein optischer Schnitt durch die Probe mit entfernten Bildanteilen, die aus den Präparatebenen außerhalb des Tiefenschärfebereichs stammen. Im Vergleich zu konventioneller Mikroskopie besteht ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis

sowie eine um den Faktor 2 verbesserte Auflösung in axialer (Z-) Richtung (www.zeiss.de).

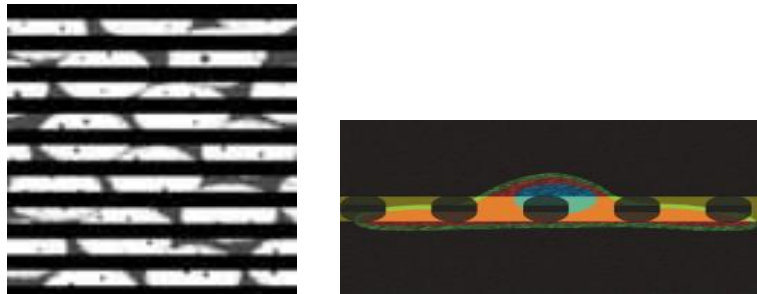


Abbildung 3: Gitterstruktur und Schärfebereich des eingebrachten Gitters

Mittels dieses Imaging-Prinzips wurden Aufnahmen und Z-Stapel-Serien der Schnittdicke 0,1µm angefertigt und letztere mit spezieller Computer-Software (LSM Image Browser; Carl Zeiss, Jena) zu 3D-Rekonstruktionen verarbeitet.

Zum Vergleich der Bildqualität wurden im Institut der Anatomie II, Jena und bei Zeiss, Jena einige Aufnahmen und z-Stapel an konfokalen Laser Scanning Mikroskopen (CLSM) angefertigt.

Beim CLSM ermöglicht eine konfokal zur Fokusebene angeordnete Lochblende die Darstellung einer einzigen Ebene einer Probe. Durch punktuell sequentielle Abtastung der einzelnen Ebenen entsteht ein optischer Schnitt, der ein kontrastreiches, in x, y und z hoch aufgelöstes Abbild der Probe darstellt (www.zeiss.de).

Einige Daten der verwendeten konfokalen Lasermikroskope zeigt die Tabelle 2.

	LSM 310 (Carl Zeiss, Jena)	LSM 510 (Carl Zeiss, Jena)
Anregung	Argon-Laser (488 nm) Helium-Neon-Laser (543 nm)	Laser Argon (488 nm) DPSS-Laser (561 nm)
Objektiv	Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil	Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC
Filter	longpass filter LP 505 (für Alexa 488) longpass filter LP 575 (für Alexa 594)	LP 505 LP 575

Tabelle 2: LSM-Daten

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Kultivierung

4.1.1 Organisation von Vimentin und CH65 im Chondrozyten

4.1.1.1 Der runde Chondrozyt

Bilder konventioneller Fluoreszenzmikroskopie zeigen Vimentin im noch ursprünglichen Chondrozyten als ein dichtes intrazelluläres Netzwerk, welches die gesamte Zelle durchspannt. Der Nukleus sowie Vakuolen werden von den Faserzügen ausgespart, gleichzeitig aber von einem Faserring umrandet. Trotz der Kompaktheit des Maschenwerkes sind einzelne Faserverläufe erkennbar und voneinander abgrenzbar. Neben diesen die Zelle durchziehenden Strängen finden sich vereinzelt punktuelle Fluoreszenzsignale. Bei Betrachtung wird ferner eine Intensitätserhöhung des Vimentins in unmittelbarer Nähe zum Zellkern ersichtlich (s. Abb. 4).

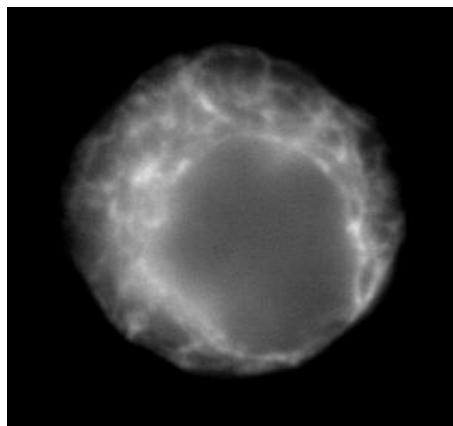


Abbildung 4: Vimentin-Netzwerk (100x)

Mit Hilfe des ApoTome wurden optische Schnitte vom oberen Ende der Zelle in Richtung des Objektträgers angefertigt (s. Abb. 5).

Die Fasern des Vimentin-Netzwerkes entspringen am oberen Zellende von einem gemeinsamen Punkt und breiten sich in horizontaler und vertikaler Richtung aus. Ein Großteil der Fasern verläuft dabei in horizontaler bzw. schräg horizontaler Verlaufsrichtung, erkennbar durch strangförmige Fluoreszenzsignale. Punktuelle Anfärbungen sind seltener und zeigen sich vor allem perinukleär. In mehreren

aufeinander folgenden Bildern nachweisbar zeugen sie für einen perinukleären vertikalen Faserverlauf. Vereinzelt ist auch an der Zellmembran und im Zytoplasma eine vertikale Verlaufsrichtung nachweisbar. In einzelnen Schnittbildern findet man ferner den schon beschriebenen perinukleären Ring wieder. Auch zeigen sich Schwankungen der Signalintensität, deren Maximum sich an Orten des vertikalen Faserverlaufs findet. Schnittbilder in Höhe des Objektträgers zeigen die Adhärenz der Zelle, welche vor allem durch die vertikalen Fasern gegeben ist.

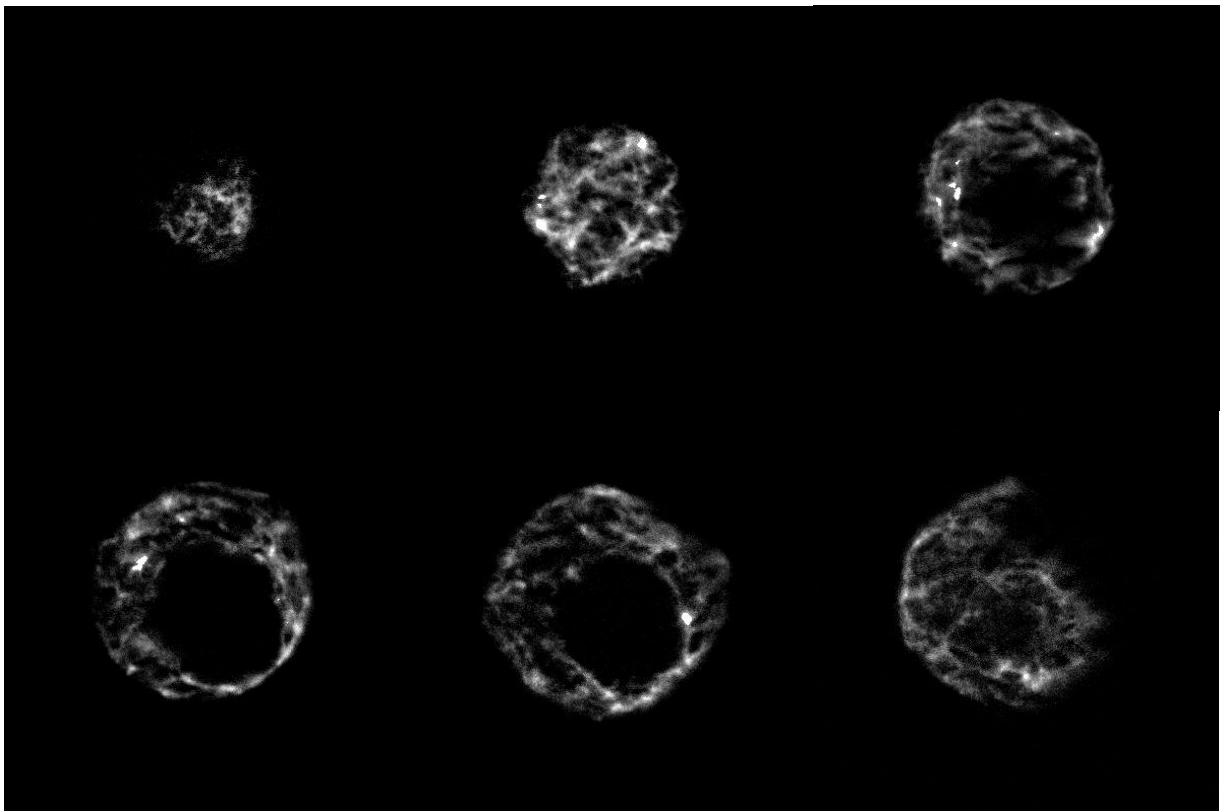


Abbildung 5: Galerieansicht z-Stapel

Optische Schnitte zur Darstellung des Vimentin-Netzwerkes (100x)

Auch CH65 wurde mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Hier erstrecken sich Fluoreszenzsignale im rundlichen, noch nicht dedifferenzierten Chondrozyten über das gesamte Zytoplasma und weisen perinukleär partiell Signalverstärkungen auf. Zellkern und Vakuolen werden von CH65 nicht markiert, indessen durch einen umrandenden Faserring von dem Netzwerk abgegrenzt. In Abbildung 6 zeigt sich das typische Erscheinungsbild einer CH65-markierten, rundlichen Zelle, dessen intrazelluläres Netzwerk sich aus einigen strangförmigen und überwiegend granulären Markierungen zusammensetzt. Durch die hauptsächlich granuläre Darstellung des Netzwerkes wirkt dieses erst wenig organisiert.

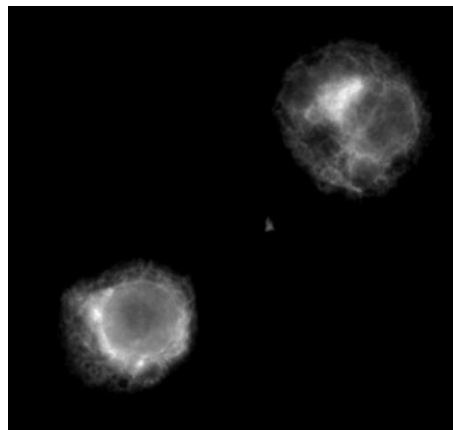


Abbildung 6: CH65-Netzwerk (100x)

Mittels optischer Schnitte erkennt man, dass auch CH65 von einem Punkt am oberen Zellende entspringt und sich von dort innerhalb der Zelle ausbreitet (s. Abb. 7). Analog zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erscheint auch in den Einzelbildern des z-Stapels das Signalmuster von CH65 vorrangig granuliert und damit nur gering organisiert. Einzelne, punktuelle Markierungen setzen sich über mehrere Einzelbilder fort und deuten so auf eine vertikale Faserverlaufsrichtung hin. Diese sind vorrangig um den Zellkern herum und am Zellrand angeordnet und erscheinen jeweils über einen horizontalen Faserring miteinander verbunden. Im Zellplasma findet man neben der vertikalen Ausbreitungsrichtung des CH65 Netzwerkes auch einige wenige horizontale Faserstränge. Lokal erhöhte Intensitäten finden sich perinukleär und damit vor allem an Orten vertikalen Verlaufs. Über mehrere vertikale Faserzüge, die auf einem horizontalen Ring zu liegen scheinen, adhäriert das Netzwerk auf dem Objektträger.

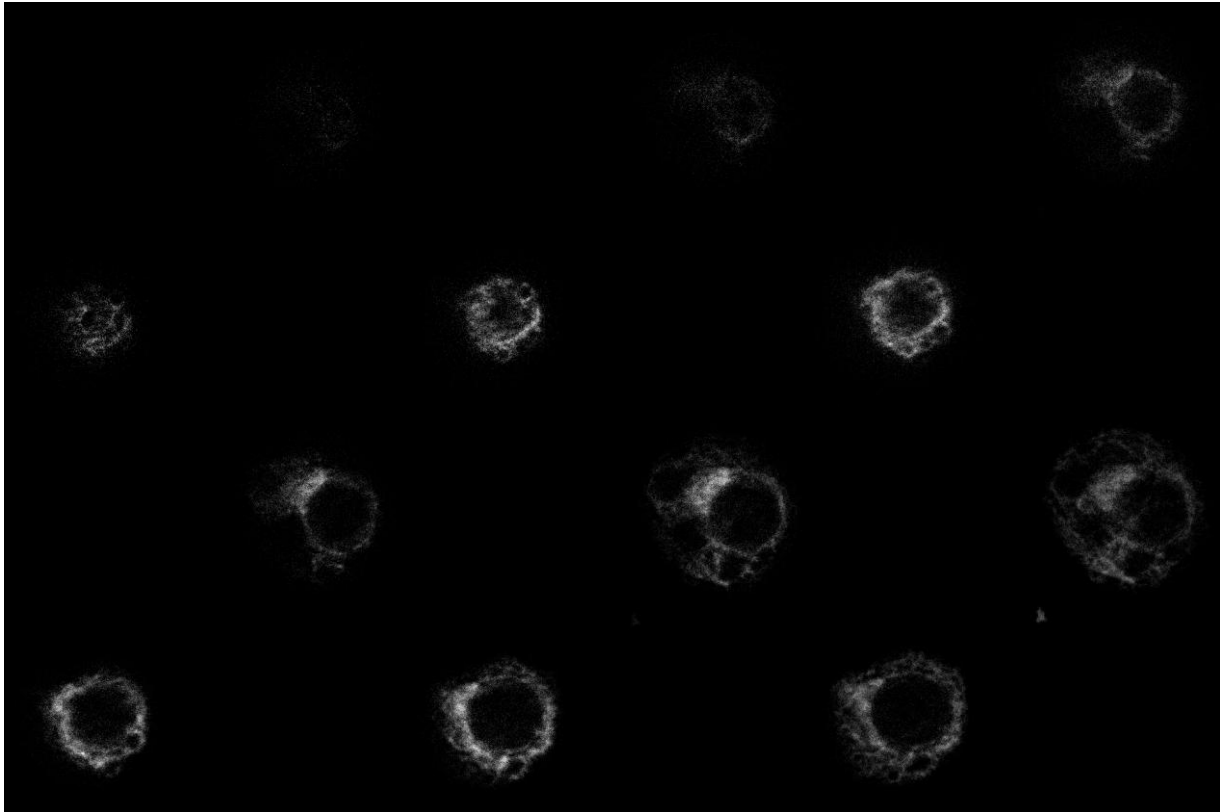


Abbildung 7: Bilderstapel des CH65-Netzwerkes rundlicher Chondrozyten (100x)

Angesichts der ähnlichen Verteilungsmuster beider Intermediärfilamentproteine bei den Einzelfärbungen sollte ein direkter Vergleich mit Hilfe von Doppelfärbungen klären, ob innerhalb einer Zelle eine Kolo­kalisation beider Netzwerke vorherrscht. Die Klärung dieser Frage sollte ferner Aufschluss über die Identität des CH65 geben.

Konventionell erstellte Mehrkanalbilder einzelner Zellen bestätigen auf den ersten Blick die sehr starke Ähnlichkeit der Verteilungsmuster von Vimentin und CH65. So sprechen viele gelb-orange gefärbte Bereiche für Überlagerungen der Einzelfarben und deuten auf mögliche Kolo­kalisationen hin (s. Abb. 8). Daneben weisen Lokalisationen einfacher Anfärbung auf Unterschiede beider Netzwerke hin.

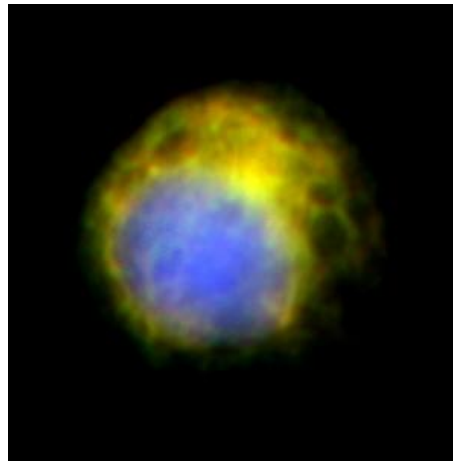


Abbildung 8: Mehrkanalbild (100x)

Auch nähere Betrachtungen der für das Mehrkanalbild erstellten Einzelbilder ergeben, dass beide Intermediärfilamentproteine in vielen Bereichen der Zelle ein übereinstimmendes Expressionsmuster aufweisen.

Jedoch erscheinen bei Vergrößerung gleich verlaufende Strukturen nur partiell kolokalisiert und im weiteren Verlauf nur dicht zusammen liegend. Ferner wird hier deutlich, dass das Netzwerk von CH65 granulierter und weniger organisiert als das filamentöse Vimentin-Netzwerk erscheint. Lokalisationen erhöhter Intensität ähneln sich hingegen wieder sehr und finden sich vor allem im Bereich des Zellkernes (s. Abb. 9).

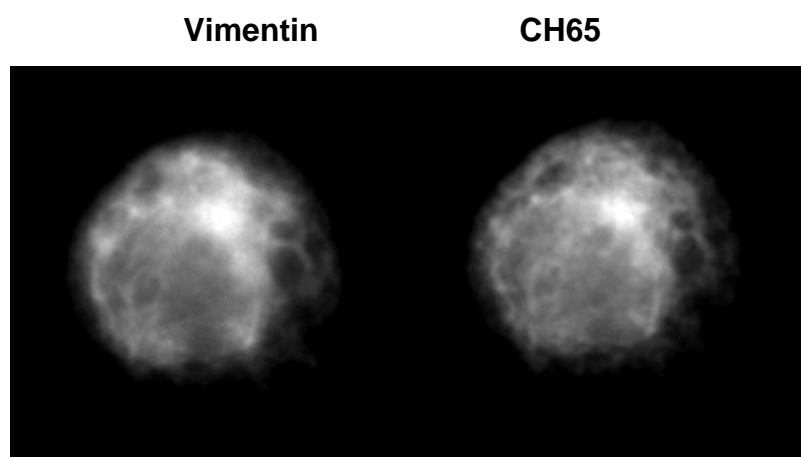


Abbildung 9: Vergleich Vimentin und CH65 (100x)

In Anbetracht von Überlagerungen durch „*out-of-focus*“-Informationen im Tiefenschärfebereich eines konventionell erstellten Fluoreszenzmikroskop-Bildes (das Bild besteht neben der fokussierten Ebene zusätzlich aus Signalbeiträgen darüber und darunter liegender Strukturen) kann die Frage der Kolo-kalisation nicht zweifelsfrei geklärt werden. Nur der Vergleich optischer Schnitte der Zelle kann einen exakteren Aufschluss über eine kongruente bzw. divergente Verteilung beider Intermediärfilamentproteine geben.

Hier werden deutliche Unterschiede in der Anordnung beider Netzwerke ersichtlich. Mit der Betrachtung eines z-Stapels am oberen Ende einer Zelle beginnend, erkennt man in den ersten Einzelbildern eine alleinige Anfärbung des Vimentin-Netzwerkes. Positive CH65 Signale erscheinen, wenn sich das Vimentin-Netzwerk bereits weiter ausgebreitet hat. Dies führt dazu, dass die Markierungen des CH65 stets zentraler gelegen erscheinen. In Bereichen gemeinsamer Anfärbung wird mitunter ein ähnliches Muster ersichtlich. Jedoch scheinen die Filamente zumeist dicht beieinander gelagert, aber nicht kolo-kalisiert zu sein. Ferner wirkt das Vimentin-Netzwerk auch hier durch die Anfärbung von Strängen organisierter als das sich vorwiegend granulär darstellende CH65-Netzwerk. Optische Schnitte in Höhe des Objektträgers weisen schlussendlich nur noch eine punktuelle Anfärbung des CH65 auf. Angefertigte Schemata verdeutlichen die Unterschiede beider Verteilungsmuster nochmals (s. Abb. 10).

Betrachtet man Einzelbilder beider Proteine ungeachtet ihrer Schnittebene, zeigen sich wieder große Ähnlichkeiten hinsichtlich des Verteilungsmusters. Es scheint fast, als seien die Netzwerke gegeneinander verschoben (s. Abb. 11).

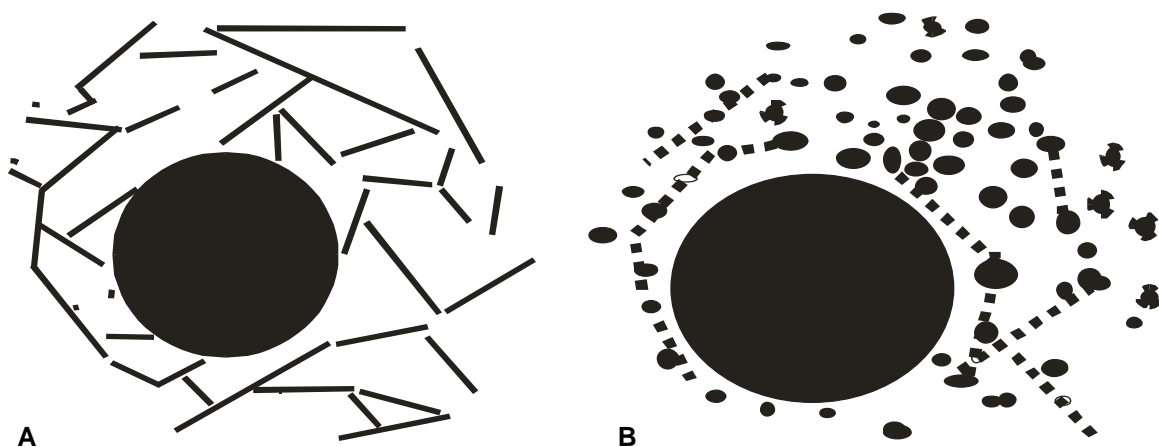
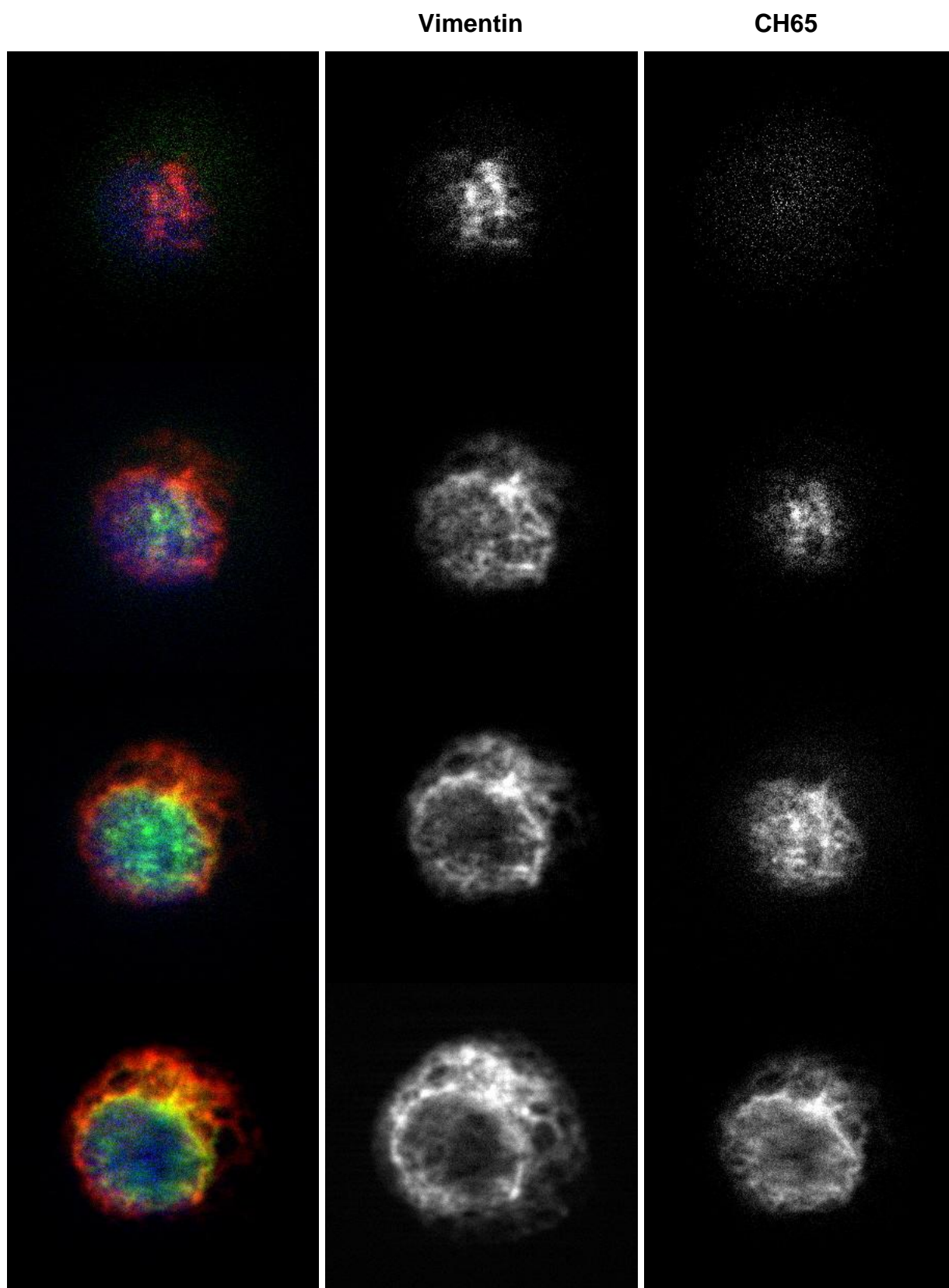


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Vimentin (A) und CH65 (B)



(Fortsetzung nächste Seite)

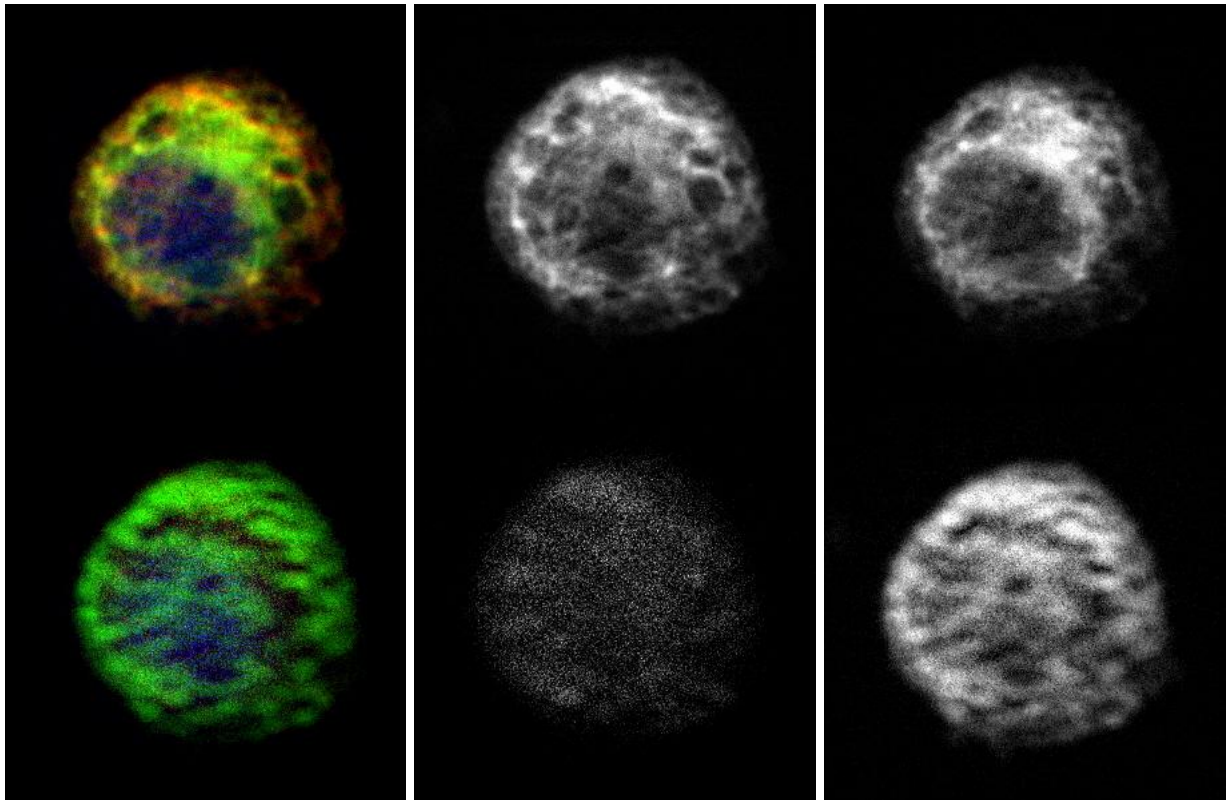


Abbildung 11: optische Schnitte eines rundlichen Chondrozyten (100x)

Abbildung 12 zeigt 3D-Rekonstruktionen eines z-Stapels. Aufgrund der Dichte der Netzwerke können mit dieser Methode nur vereinzelt Faserzüge dargestellt werden. Die Rekonstruktionen dienen somit vorrangig der Illustration der prinzipiellen Verteilungsschwerpunkte.

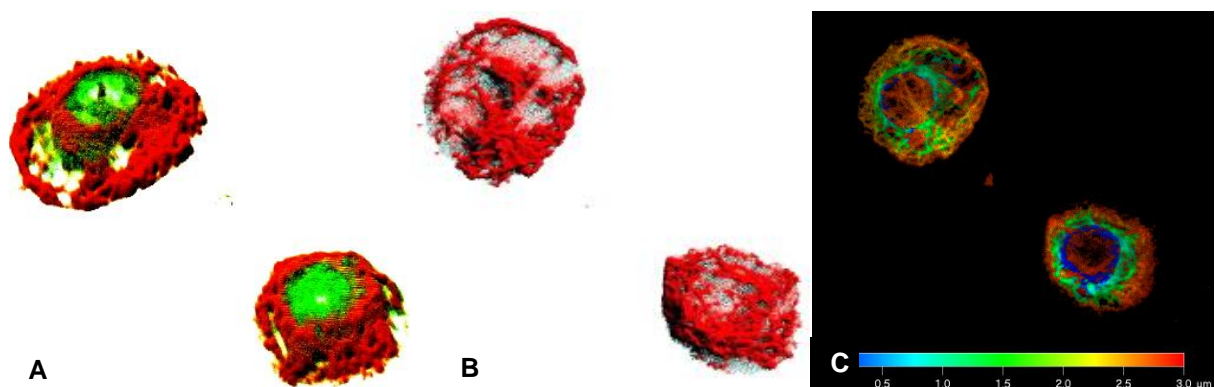


Abbildung 12: Rundlicher Chondrozyt als 3D-Rekonstruktion (100x)

- A: Darstellung der Verteilungsschwerpunkte von Vimentin (rot) und CH65 (grün)
- B: Einzeldarstellungen von Vimentin
- C: Tiefenkodierung von Vimentin

4.1.1.2 Der plastersteinartige Chondrozyt

Mit beginnender Ausbreitung der Zelle breitet sich auch das Vimentin-Netzwerk aus und erstreckt sich so weiterhin über das gesamte Zytoplasma (s. Abb. 13). Durch diese Zellausweitung treten die einzelnen Fasern des Netzwerkes weiter auseinander, wodurch die einstige Kompaktheit schwindet und die Raumarchitektur zunehmend visualisiert wird. Man erkennt radiär, parallel und sich in ihrer Anordnung überkreuzende Fasern innerhalb des Zytoplasmas. Diese horizontal verlaufenden Stränge ziehen dabei vom Rand des Nukleus nach peripher bis hin zu der Zellmembran, entlang der vereinzelt Faserverläufe erkennbar sind. Einige wenige perinukleär und vereinzelt im Zytoplasma liegende punktuelle Fluoreszenzsignale weisen auf vertikale Faserzüge hin. Ähnlich den runden Chondrozyten findet sich zumeist ein perinukleärer Fasersaum, gebildet durch Verdichtungen einzelner Fasern. In diesem Bereich finden sich nach wie vor Signalverstärkungen.

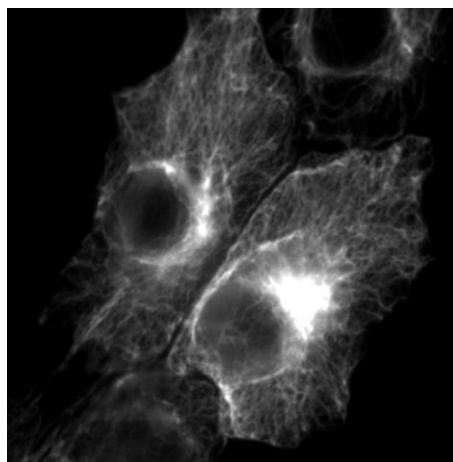


Abbildung 13: Vimentinmarkierung (100x)

Die z-Stapel-Einzelbilder weisen ein Ausbreitungsmuster des Vimentin-Netzwerkes gleich dem rundlicher Chondrozyten auf (s. Abb. 14). Das Netzwerk entspringt am oberen Ende der Zelle und breitet sich nach peripher aus. Da diese Zellen ausgenommen der unmittelbaren Region um den Zellkern schon recht abgeflacht sind, zeigt sich vor allem ein schräg horizontaler bis horizontaler Faserverlauf. Es findet sich die Architektur eines filigranen Fasernetzwerkes wieder, welches bereits in den konventionellen Bildern wahrgenommen wurde. Vertikaler Verlauf lässt sich auch hier durch punktuelle Fluoreszenzsignale innerhalb mehrerer Schnittebenen identifizieren. Diese Signale sind spärlich und zeigen sich, gleich der konventionellen

Fluoreszenzmikroskopie, innerhalb des perinukleären Ringes und einzeln verstreut im Zytoplasma. Ferner entsprechen diese Lokalisationen maximaler Signalintensität.

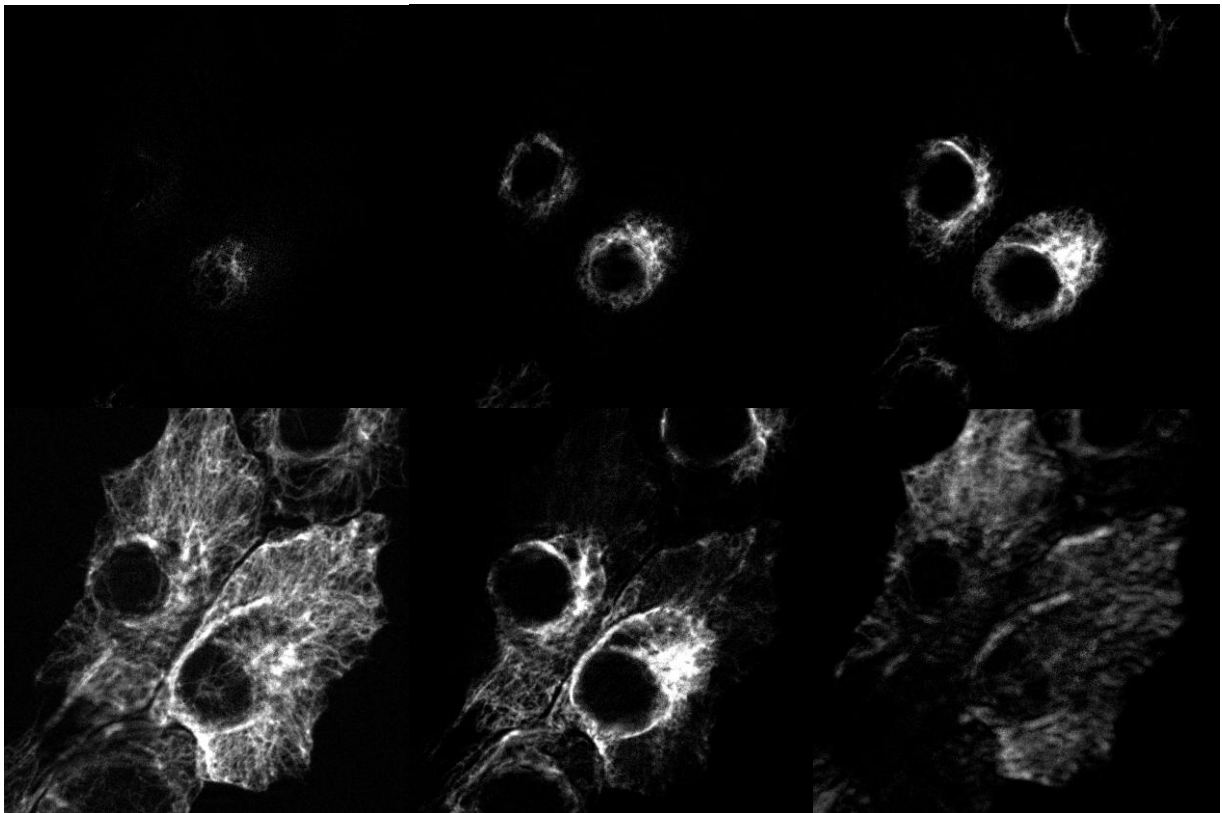


Abbildung 14: z-Stapel Vimentin markierter Chondrozyten (100x)

Mit Veränderung des Phänotyps der Chondrozyten kommt es auch im Färbemuster von CH65 zu leichten Änderungen. F2 erzeugt zwar auch bei den pflastersteinartigen Chondrozyten eine granuliert Markierung, jedoch ist diese, wie Abbildung 15 zeigt, vor allem perinukleär vorherrschend, während sie in Richtung Peripherie teils in eine filamentöse Markierung übergeht. Dort zeigt sich ein organisiertes Bild mit parallel oder radiär verlaufenden und sich überschneidenden Fasern, die bei der rundlichen Zelle in dem Maß noch nicht vorhanden waren. Ein perinukleärer Saum und ein die Zelle teilweise umfassender Faserzug sind nachweisbar. Die Signalintensivität des CH65 konzentriert sich weiterhin auf den perinukleären Bereich und fällt zur Zellmembran hin ab.

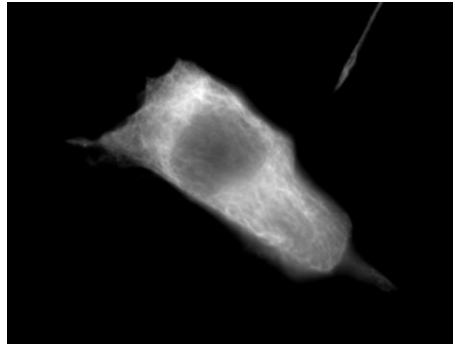


Abbildung 15: CH65-Markierung (100x)

Z-Stapel-Einzelbilder verdeutlichen diese Architektur des CH65 (s. Abb. 16). Auch hier erkennt man granuläre Signale zirkulär um den Nukleus herum und im Zytoplasma, sowie filamentöse Signale, die den horizontalen Verlauf der Fasern dokumentieren. Gleich den konventionellen Bildern wird der perinukleäre Ring sichtbar, teils als breiter Saum granulärer Signale, teils als schmaler, filamentöser Ring. Signalverstärkungen finden sich in Schnittebenen des Zellkerns perinukleär.

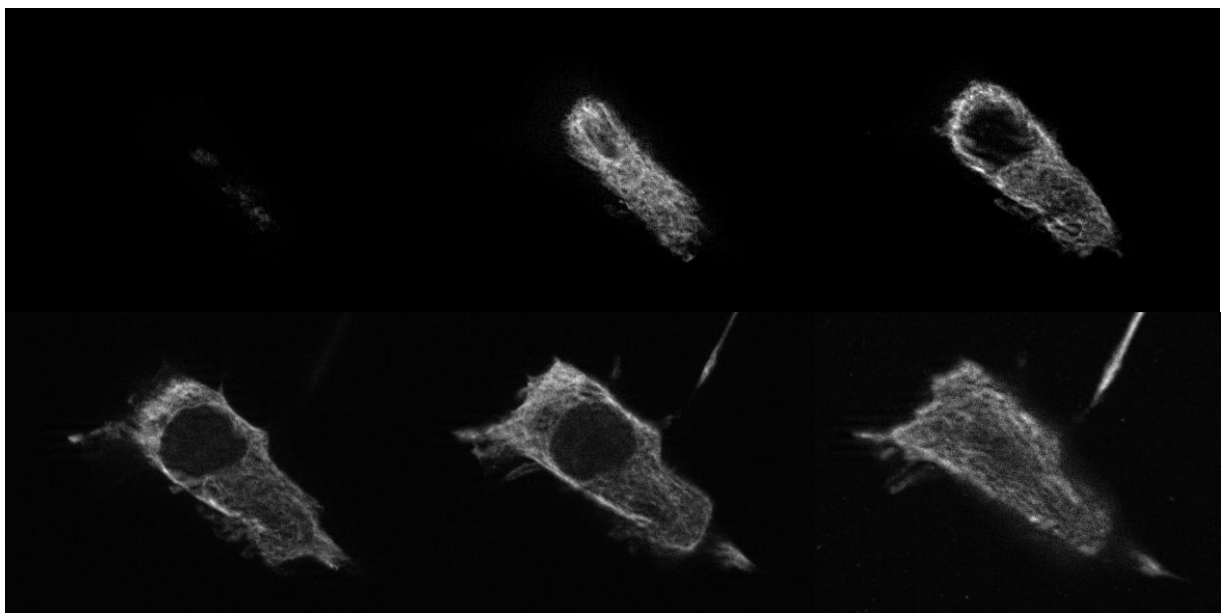


Abbildung 16: optische Schnitte zur Illustration des CH65-Netzwerkes (100x)

Analog dem Mehrkanalbild rundlicher Chondrozyten zeigt auch hier die Überlagerung beider Markierungen erneut ein sehr ähnliches Anfärbemuster der Filamente (s. Abb. 17). Vor allem in der Peripherie, wo auch CH65 mitunter ein filamentöses Erscheinungsbild zeigt, erkennt man bei vergrößerter Betrachtung eine scheinbare Kongruenz der Fluoreszenzsignale von Vimentin und CH65.

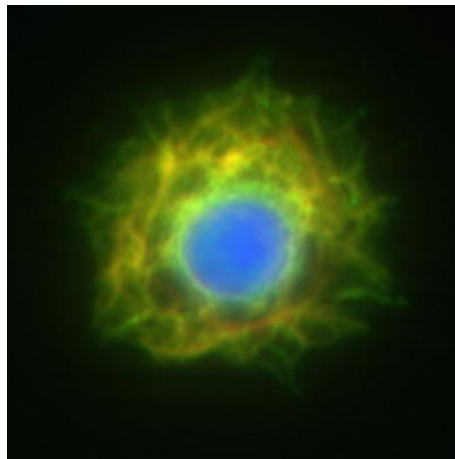


Abbildung 17: Mehrkanalbild (100x)

Auch nähere die Betrachtung der Einzelbilder lässt Kolo-kalisationen beider Filamente vermuten (s. Abb. 18). Es scheint, als sei das Muster nahezu gleich, nur zeigt sich dessen Zusammensetzung bei CH65 aus granulären Signalen, bei Vimentin aus filamentösen. Auch wirkt das CH65-Netzwerk dabei noch in sich ungeordneter.

Im Weiteren wird ersichtlich, dass bei CH65 größere Schwankungen der Signalintensität vorherrschen als bei Vimentin. Dessen Netzwerk erscheint homogener, während das Netzwerk von CH65 perinukleär eine markant stärkere Anfärbung als peripher zeigt.

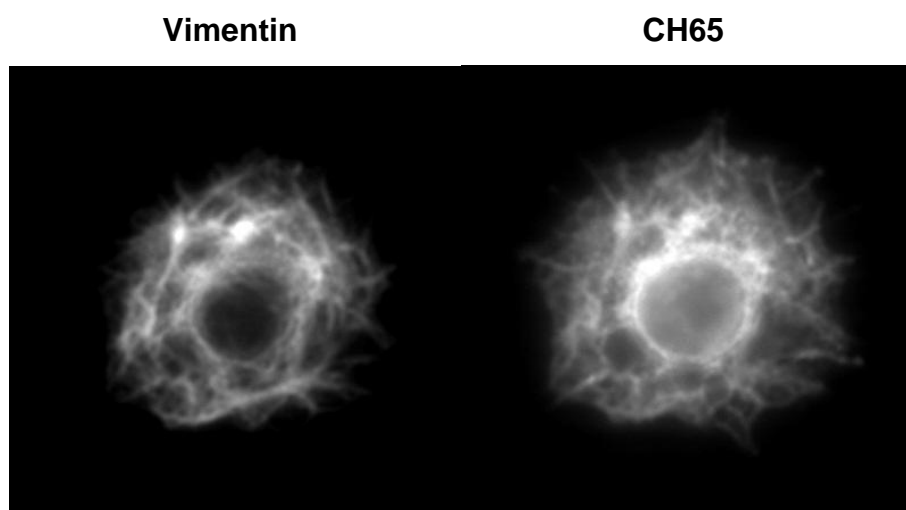


Abbildung 18: Gegenüberstellung Vimentin vs. CH65 (100x)

Auch hier relativieren z-Stapel die in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie beobachteten Ähnlichkeiten. Wie schon bei den rundlichen Chondrozyten beginnt die Darstellung und Ausbreitung des Vimentin-Netzwerkes in höher gelegenen optischen Schnitten als die des CH65. In Schnittbildern gemeinsamer Fluoreszenzsignale liegt CH65 weiterhin meist zentraler als Vimentin, aber es zeigen sich auch einige, von beiden markierte Zellregionen. Liegen diese Bereiche zentral, überwiegt die Signalintensität von CH65, findet man sie peripher, ist die Signalstärke von Vimentin höher. In diesen Regionen finden sich teils gemeinsame Faserverläufe, teils differente. Genauere Betrachtungen gemeinsamer Faserverläufe zeigen wenig kolokalisierte Signale, sondern oftmals eher dicht beieinander liegende Intensitätsmaxima finden sich bei beiden Filamenten jeweils partiell perinukleär. Ähnlich der rundlichen Chondrozyten ist auch hier die Adhärenz zum Objektträger überwiegend durch Fasern des CH65-Netzwerkes gegeben. Auch das Phänomen der Ähnlichkeit beider Netzwerke auf verschiedenen optischen Ebenen ist hier wieder zu finden (s. Abb. 20).

Abbildung 19 zeigt schematische Darstellungen beider Verteilungsmuster.

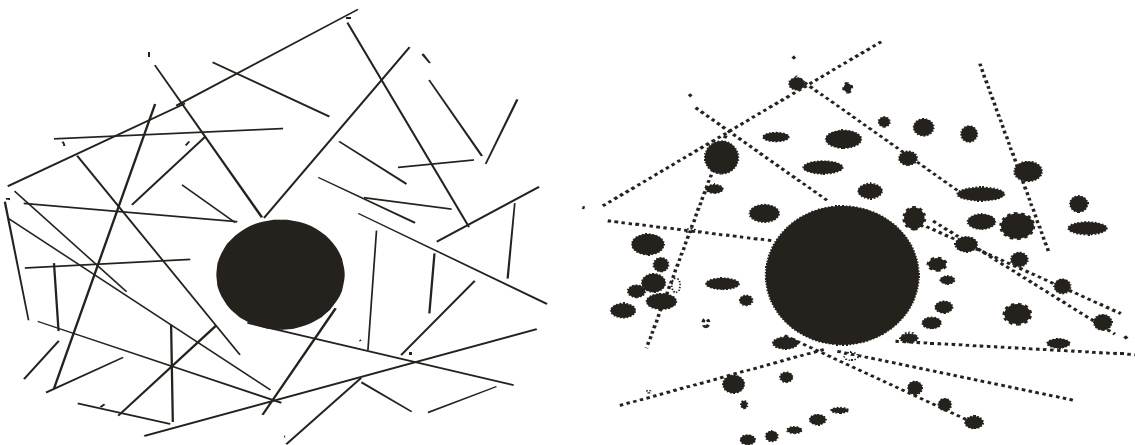
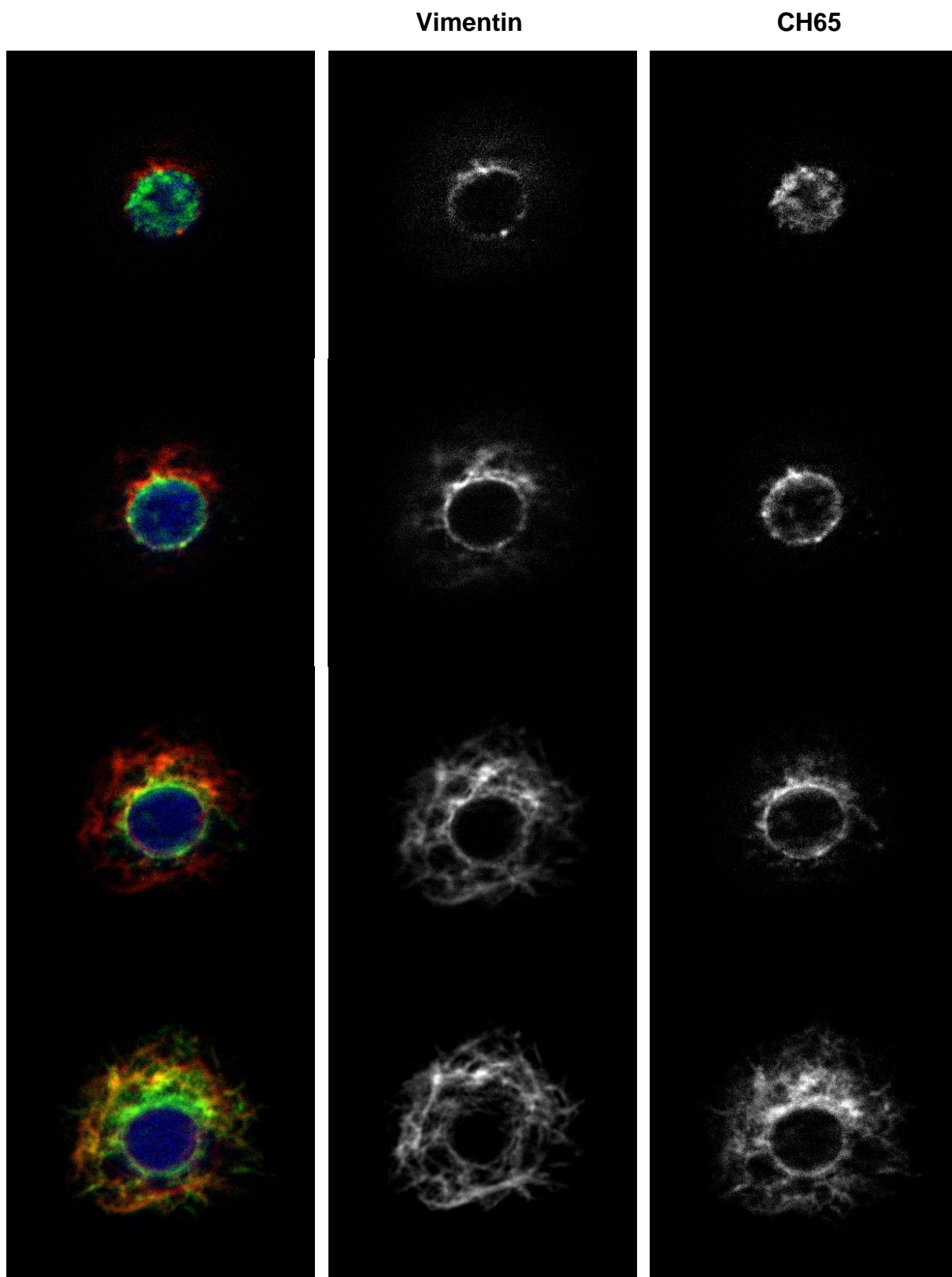


Abbildung 19: Schemata des Vimentin- (A) und CH65-Netzwerkes (B)



(Fortsetzung nächste Seite)

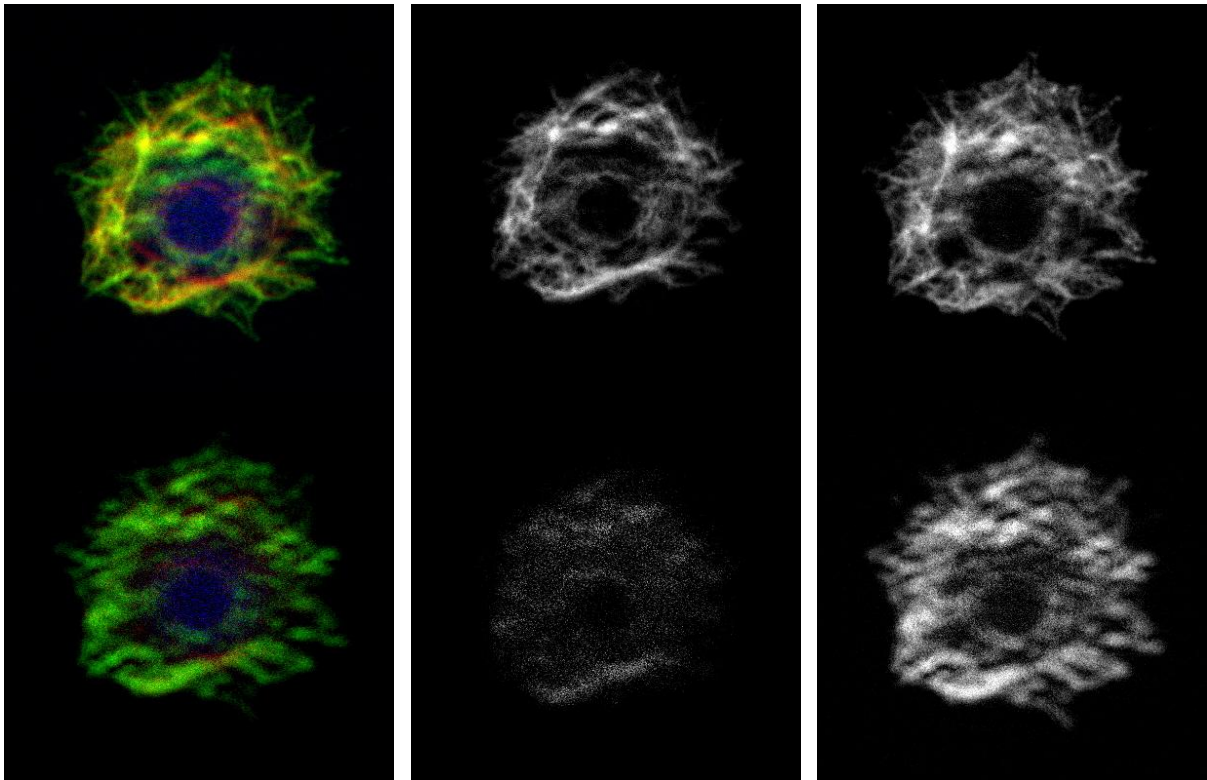


Abbildung 20: z-Stapel eines pflastersteinartigen Chondrozyten (100x)

3D-Rekonstruktionen zeigen die Verteilungsschwerpunkte plastersteinartiger Chondrozyten auf. In Abbildung 21 erkennt man, dass Vimentin das CH65-Netzwerk größtenteils umschließt, während CH65 vor allem zentral und in Nähe des Objektträgers sichtbar wird.

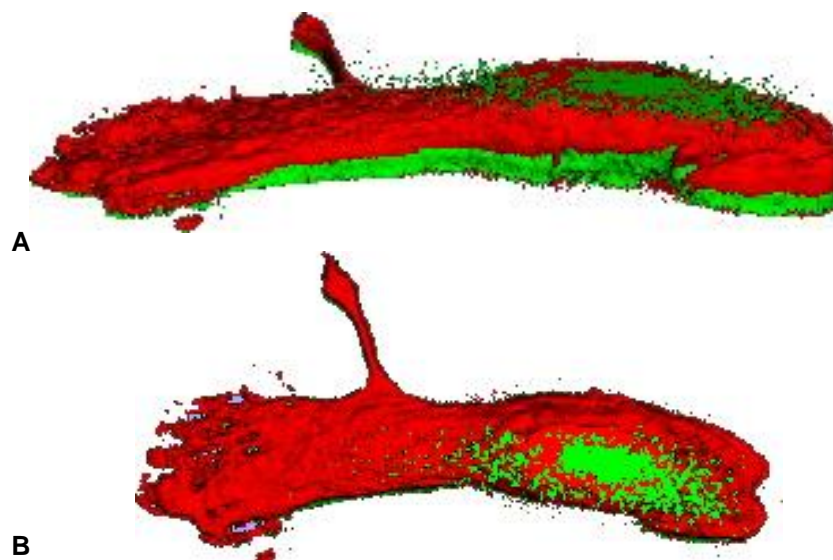


Abbildung 21: 3D-Rekonstruktion eines pflastersteinartigen Chondrozyten

A/B: verschiedene Ansichten einer Zelle; Vimentin (rot), CH65 (grün)

4.1.1.3 Der fibroblastoide Chondrozyt

Aufgrund der Größe fibroblastoider Chondrozyten zeigt sich in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ein Vimentin-Netzwerk, dessen Feinstruktur deutlich erkennbar ist (s. Abb. 22). Ungeachtet der Zellgröße gleicht die Organisation der des pflastersteinartigen Chondrozyten. So lassen sich unzählige dicht beieinander liegende Stränge beobachten, die von dem perinukleären Ring zur Zellmembran ziehen. Anders als bei rundlichen Chondrozyten ist diese durch einen, die Zelle umrandenden Fasernsaum gekennzeichnet. Punktuelle Vimentin-Signale finden sich bei diesen Chondrozyten nur noch vereinzelt.

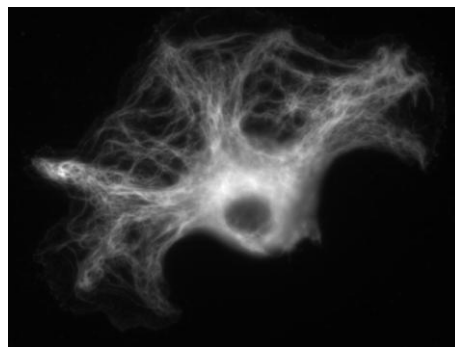


Abbildung 22: Vimentin-Netzwerk (100x)

Auch die Signalmuster des CH65 haben sich gegenüber dem des pflastersteinartigen Chondrozyten kaum verändert (s. Abb. 23). Zentrale Zellregionen weisen nach wie vor eine granuläre Markierung auf, während peripher vermehrt filamentöse Signale auffindbar sind. Abweichend zu runden oder pflastersteinartigen Zellen wird das Zytoplasma dieser Chondrozyten entlang der Zellmembran vollständig durch einen Fasernsaum umrandet.

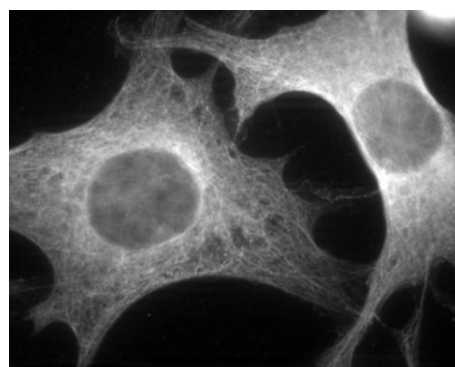


Abbildung 23: CH65-Markierung (100x)

Ein Vergleich der am konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Netzwerke zeigt auch hier ein sehr ähnliches Bild der Organisation beider Intermediärfilamentproteine (s. Abb. 24). Wie bei pflastersteinartigen Chondrozyten finden sich vor allem peripher augenscheinlich kongruente Faserverläufe, während sich das CH65-Netzwerk perinukleär weiterhin durch seine dichte granuläre Markierung von dem filamentösen Signalmuster des Vimentins abgrenzt.

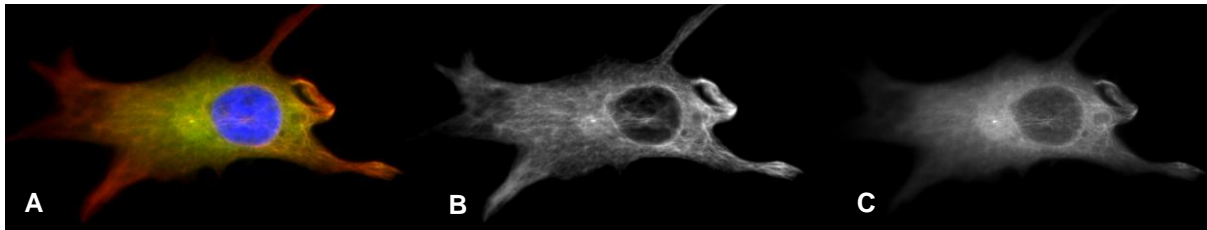


Abbildung 24: Fibroblastoider Chondrozyt (100x)

A: Doppelfärbung Vimentin (rot) / CH65 (grün), zusätzliche Kernfärbung (blau)
B: Vimentin, C: CH65

Vergleichend zu den Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen wurden Bilder am konfokalen Lasermikroskop angefertigt (s. Abb. 25).

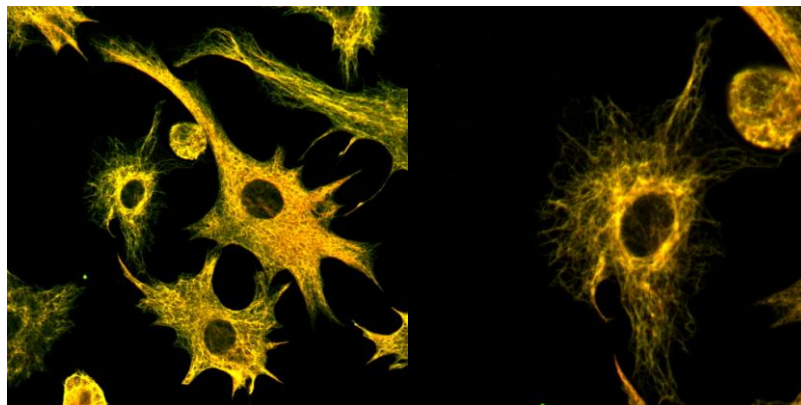


Abbildung 25: LSM-Aufnahmen fibroblastoider Chondrozyten (63x)

Am CLSM zeigen die jeweiligen Einzelbilder sowie die angefertigten z-Stapel die charakteristischen Verteilungsmuster beider Intermediärfilamentproteine (s. Abb. 26). Gleich den Fluoreszenzmikroskop-Bildern zeigt sich Vimentin als filigranes, filamentöses Netzwerk mit überwiegend horizontaler Verlaufsrichtung, während sich das CH65-Netzwerk vorwiegend granulär darstellt.

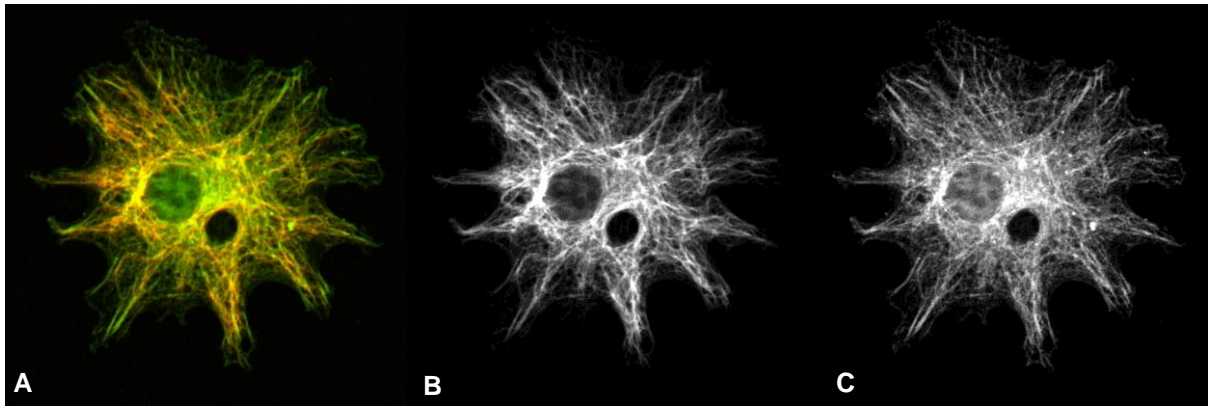


Abbildung 26: LSM-Aufnahmen fibroblastoider Chondrozyten (63x)

A: Doppelfärbung Vimentin (rot) / CH65 (grün), zusätzliche Kernfärbung (blau)

B: Vimentin, C: CH65

Angefertigte optische Schnitte am Apotome verdeutlichen nochmals durch eine höhere sichtbare Auflösung diese Strukturmerkmale beider Netzwerke (s. Abb. 28). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu den pflastersteinartigen Zellen wird auf die Ausbreitungsmuster an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.

Die in Abbildung 27 gezeigten Schemata dienen auch hier der Verdeutlichung beider Netzwerkorganisationen.

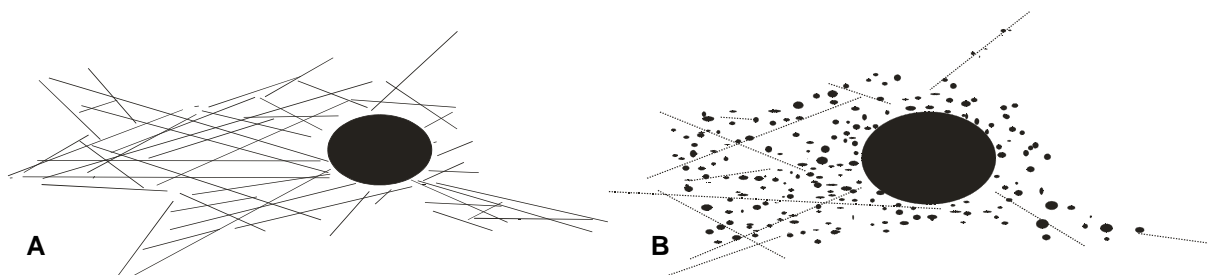


Abbildung 27: Netzwerk-Schemata von Vimentin (A) und CH65 (B)

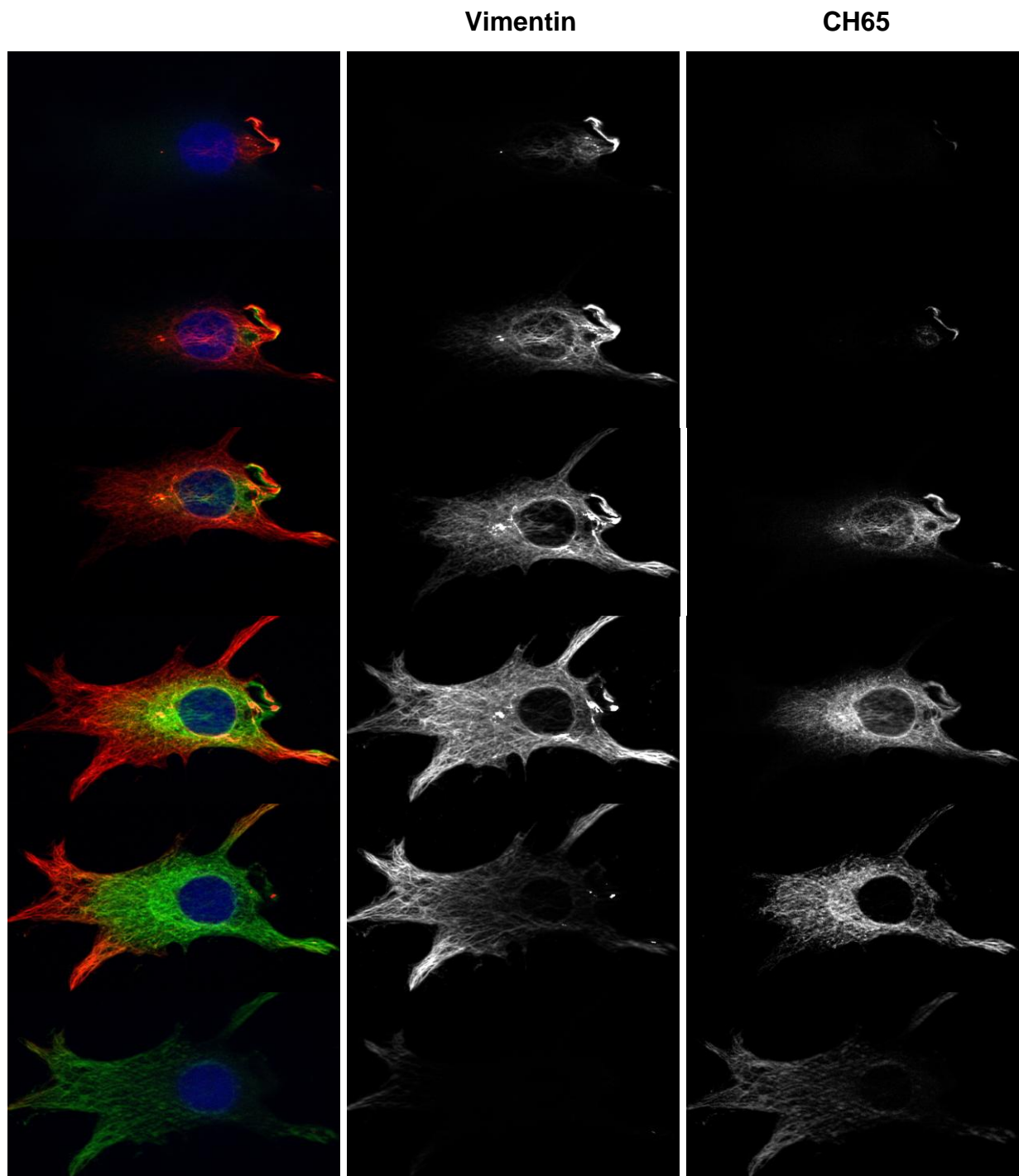


Abbildung 28: Galerieansicht optischer Schnitte durch einen fibroblastoiden Chondrozyten (100x)

3D-Rekonstruktionen dieser Chondrozyten vermitteln einen Eindruck der Organisation beider Netzwerke sowie deren Verteilung (s. Abb. 29). Aufgrund der Auflösungsgrenzen wird in Bereichen gemeinsamer Fluoreszenz jeweils nur das stärker fluoreszierende Intermediärfilamentprotein dargestellt.

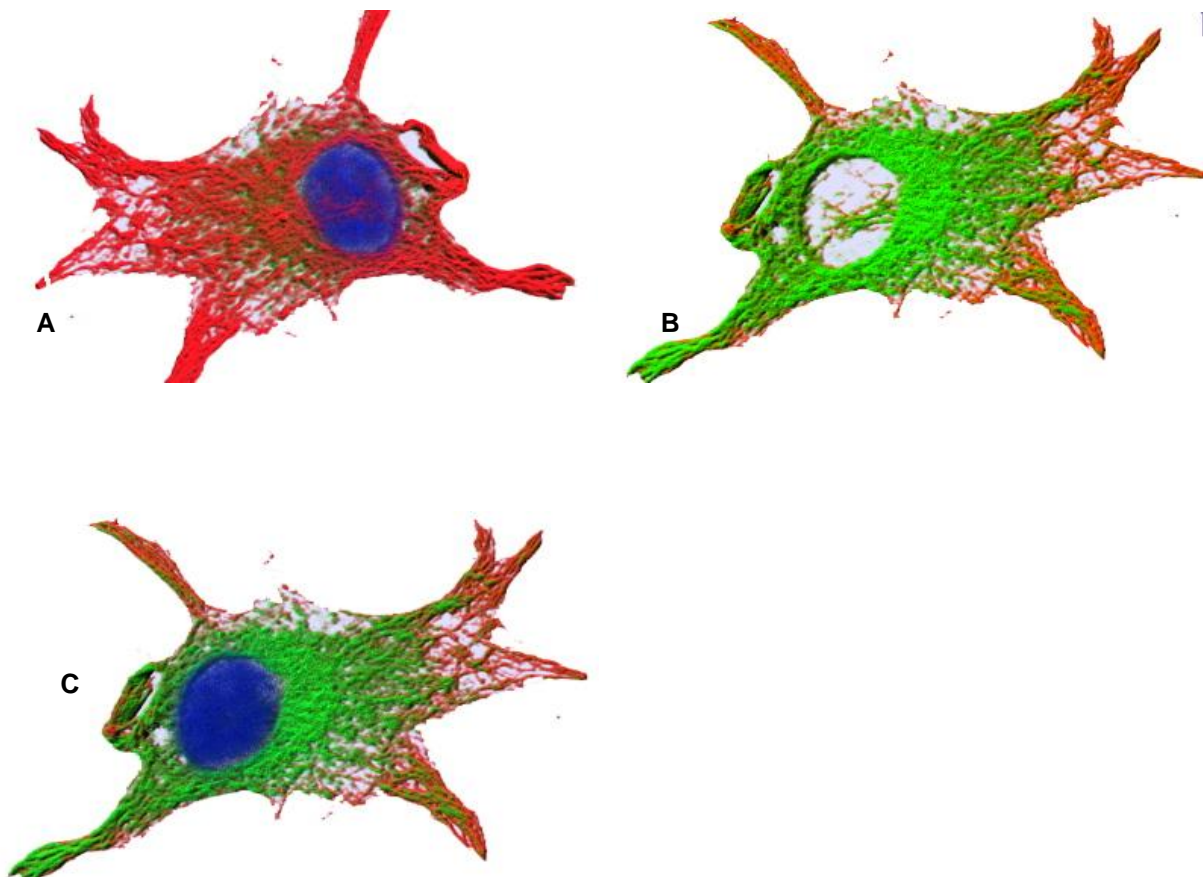


Abbildung 29: Fibroblastoider Chondrozyt als 3D-Rekonstruktion (100x)

A-C: Illustration der Verteilungsschwerpunkte von Vimentin (rot) und CH65 (grün), zusätzlich DAPI (blau) in A und C

A: Aufsicht

B/C: Ansicht der auf dem Objektträger aufliegenden Fläche

4.1.2 Organisation von Vimentin und CH65 im Fibroblasten

Angesichts der Dedifferenzierung der Chondrozyten zu einem fibroblastoiden Phänotyp wurde die Organisation beider Netzwerke zusätzlich im Fibroblasten untersucht.

In der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich, dass Vimentin auch im Fibroblasten ein dreidimensionales Netzwerk ausbildet, das dem fibroblastoider Chondrozyten gleicht.

Die Organisation des CH65 hingegen unterscheidet sich bei einigen Fibroblasten im Vergleich zum polygonalen Chondrozyten. Zeigt sich im Chondrozyten ein Muster aus granulären und filamentösen Markierungen, so färbt CH65 in diesen Fibroblasten fast ausschließlich ein filamentöses Netzwerk an, das nur vereinzelt punktuelle Markierungen aufweist (s. Abb. 30). Daneben finden sich Zellen, die analog zu den Chondrozyten perinukleär stärkere granuläre Markierungen aufweisen. Gleich den fibroblastoiden Chondrozyten ist allen die partielle perinukleäre Intensitätserhöhung.

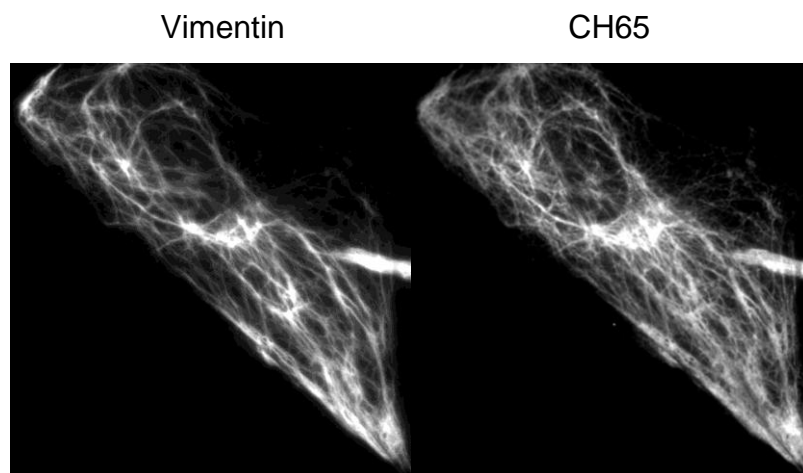


Abbildung 30: Vimentin- und CH65-Netzwerk (100x)

Ein Vergleich der Organisationen von Vimentin und CH65 ergibt auch im Fibroblasten ein sehr ähnliches Färbemuster (s. Abb. 31). Aufgrund des vorherrschenden filamentösen Erscheinungsbildes des CH65-Netzwerkes weisen beide Fasergeflechte viele augenscheinlich kongruente Faserzüge auf. Daneben wird ersichtlich, dass das Netzwerk von CH65 aus mehr Fasersträngen aufgebaut ist und so in sich kompakter wirkt.

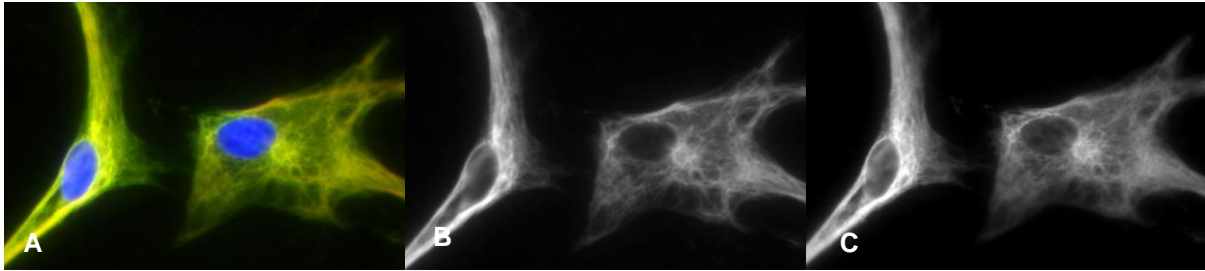


Abbildung 31: Fibroblasten (100x)

A: Mehrkanalbild Vimentin (rot) / CH65 (grün), Kernfärbung (blau)
 B: Vimentin, C: CH65

Auch z-Stapel zeigen, dass die Gemeinsamkeiten der Färbemuster der Vimentin-Netzwerke fibroblastoider Chondrozyten und Fibroblasten überwiegen, so dass im Folgenden nur der Unterschied dargestellt sei. Einzelbilder zeigen, dass Vimentin im Fibroblasten ein lichtereres Netzwerk anfärbt als im Chondrozyten. Zwischen den einzelnen Fasern finden sich größere Zwischenräume, wodurch das Maschenwerk weniger kompakt wirkt.

CH65 zeigt sich auch im ApoTome-Modus bei einigen Fibroblasten als ein organisiertes, filamentöses Netzwerk, dessen einzelne Fasern horizontal vom Nukleus in die Peripherie ziehen.

Die CH65-Organisation anderer Fibroblasten hingegen ähnelt wieder der fibroblastoider Chondrozyten. Das Netzwerk wirkt weniger organisiert und es lässt sich in den einzelnen Schnittbildern eine dichte granuläre Anfärbung perinukleär erkennen. Im Verlauf des z-Stapels sprechen die einzelnen punktuellen Markierungen auch hier für vertikal verlaufende Fasern. Von diesem granulären Fasersaum ziehen horizontale Fasern in die Peripherie.

Wie Abbildung 32 zeigt, weisen Mehrkanal-z-Stapel von Fibroblasten prinzipiell das gleiche Verteilungsmuster der beiden Netzwerke wie im Chondrozyten auf. So beginnt am oberen Zellende primär das Vimentin-Netzwerk. Daneben werden in Ebenen, in denen sowohl CH65 als auch Vimentin angeschnitten sind, gemeinsame Faserverläufe ersichtlich. Bei vergrößerter Betrachtung ergibt sich, analog zu den Chondrozyten, jedoch keine Kolo-kalisation. In Fibroblasten mit einem filamentösen CH65-Netzwerk ähnelt dieses bei Betrachtung der einzelnen optischen Schnitten bis

auf zusätzliche Faserverläufe dem beobachteten Vimentin-Netzwerk sehr. So entsteht auch hier der Eindruck, als seien die Netzwerke nur gegeneinander verschoben.

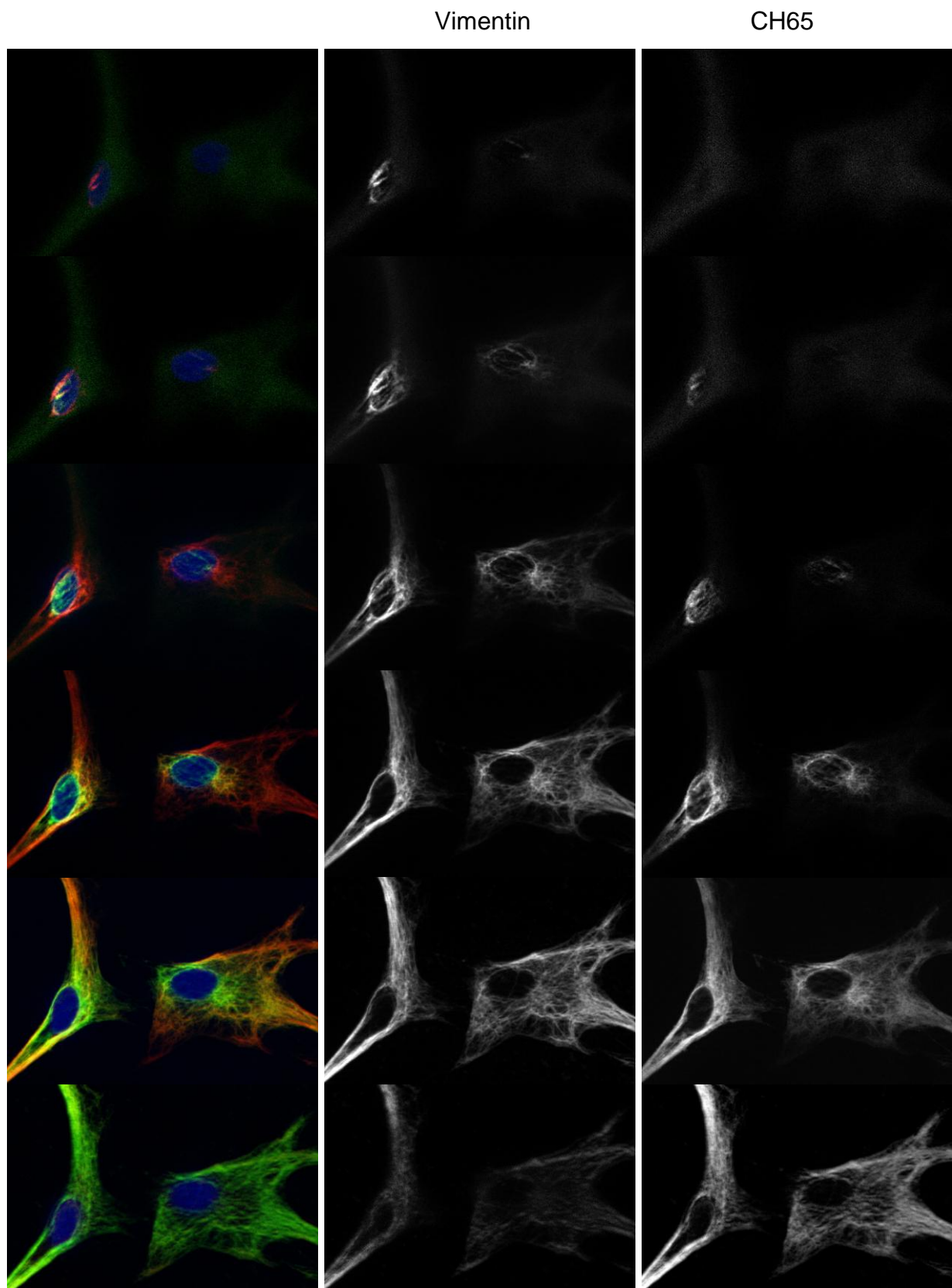


Abbildung 32: optische Schnitte durch Fibroblasten (100x)

Schematische Darstellungen beider Netzwerke (s. Abb. 33) sowie 3D-Rekonstruktionen der z-Stapel heben das grundlegende Verteilungsmuster beider Filamente noch einmal hervor (s. Abb. 34).

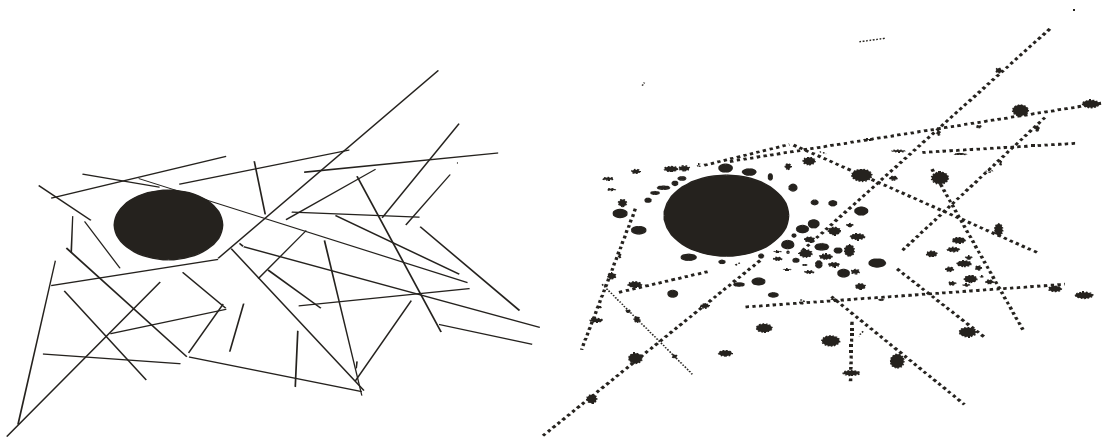


Abbildung 33: schematische Darstellung des Vimentin- und CH65-Netzwerkes in Fibroblasten

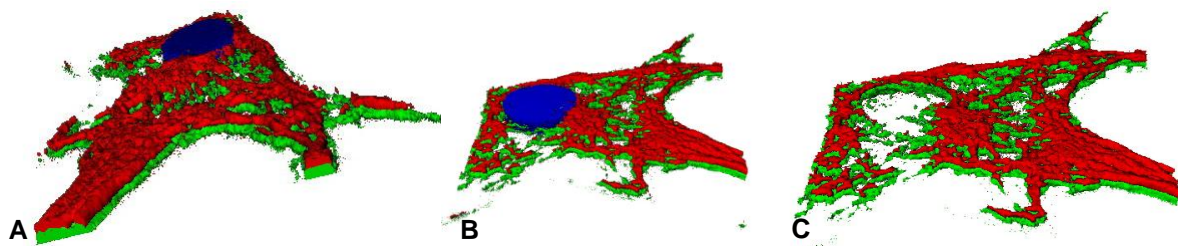


Abbildung 34: Fibroblast (3D-Rekonstruktion)

A-C: verschiedene Aufsichten einer 3D-Rekonstruktion zur Darstellung der Verteilungsschwerpunkte von Vimentin (rot) und CH65 (grün); zusätzliche Kernfärbung (blau) in A und B

4.2 *In vivo* Präparate

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Charakterisierung der Netzwerkorganisationen von CH65 und Vimentin in *in vivo* Knorpelpräparaten dar.

4.2.1 Die tiefe und mittlere Schicht

Da sich die rundlichen Chondrozyten der tiefen und mittleren Zone in Bezug auf die Raumarchitektur der Netzwerke nicht unterscheiden, kann der Vergleich in einem gemeinsamen Kapitel beschrieben werden.

Betrachtungen mittels konventionellem Fluoreszenzmikroskop zeigen zwei Netzwerke, die sich innerhalb des gesamten Zytoplasmas erstrecken. Bedingt durch die Lage des Zellkerns werden bei diesen Chondrozyten vor allem die beiden Polregionen markiert. Hier sind die Fluoreszenzsignale so kompakt, dass keine Feinstrukturen der Netzwerke sichtbar werden (s. Abb. 35). Daneben zeigen sich analog kultivierter Chondrozyten Schwankungen der Signalintensitäten und damit der Verteilungsschwerpunkte. Anders als bei den kultivierten Zellen variieren diese von Zelle zu Zelle und lassen sich keiner bestimmten Region zuordnen.

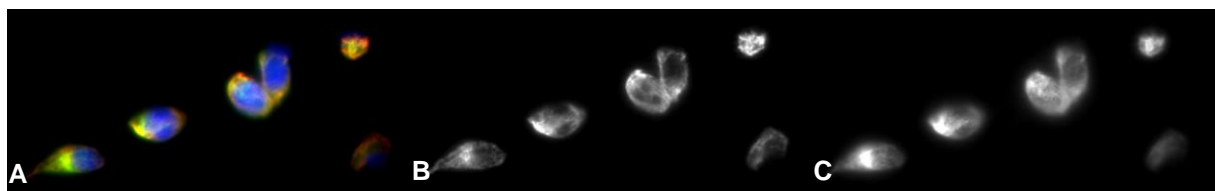


Abbildung 35: schräg verlaufende Chondrozyten der mittleren Zone (100x)

A: Doppelfärbung Vimentin (rot) / CH65 (grün), Kernfärbung (blau)
B: Vimentin, C: CH65

Im ApoTome-Modus werden die Organisationen beider Netzwerke deutlicher (s. Abb. 37). Es zeigt sich, dass sich das Vimentin-Netzwerk aus strangförmigen und granulären Markierungen zusammensetzt. Das CH65-Netzwerk färbt sich hingegen fast ausschließlich granulär an und wirkt so weniger organisiert. Gleich kultivierter Zellen findet sich das Vimentin-Netzwerk in den einzelnen Schnittebenen zumeist peripherer lokalisiert als das von CH65 und umschließt dieses dadurch. Ansonsten zeigen sich zwei sehr ähnliche Färbemuster. Aufgrund der Kompaktheit beider Netzwerke lässt sich die Frage der Kolo-kalisation nicht näher klären.

Abbildung 36 zeigt erstellte 3D-Rekonstruktionen verschiedener Chondrozyten der mittleren bzw. tiefen Schicht. Auch hier sind nur Verteilungsschwerpunkte der beiden Netzwerke erkennbar, jedoch keine Feinstrukturen.

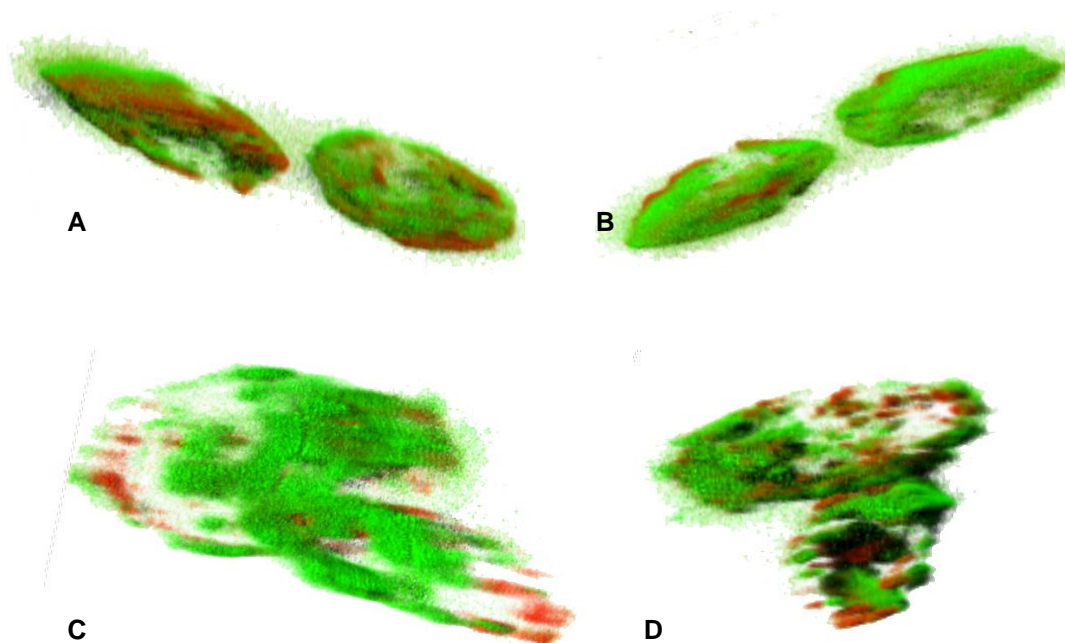


Abbildung 36: 3D-Rekonstruktion (100x)

A-D: Vimentin (rot), CH65 (grün)

A/B: Chondrozyten der mittleren Zone, Ansicht von kranial (A) und kaudal (B)

C/D: Chondrozyten der tiefen Zone, Ansicht von kranial (C) und kaudal (D)

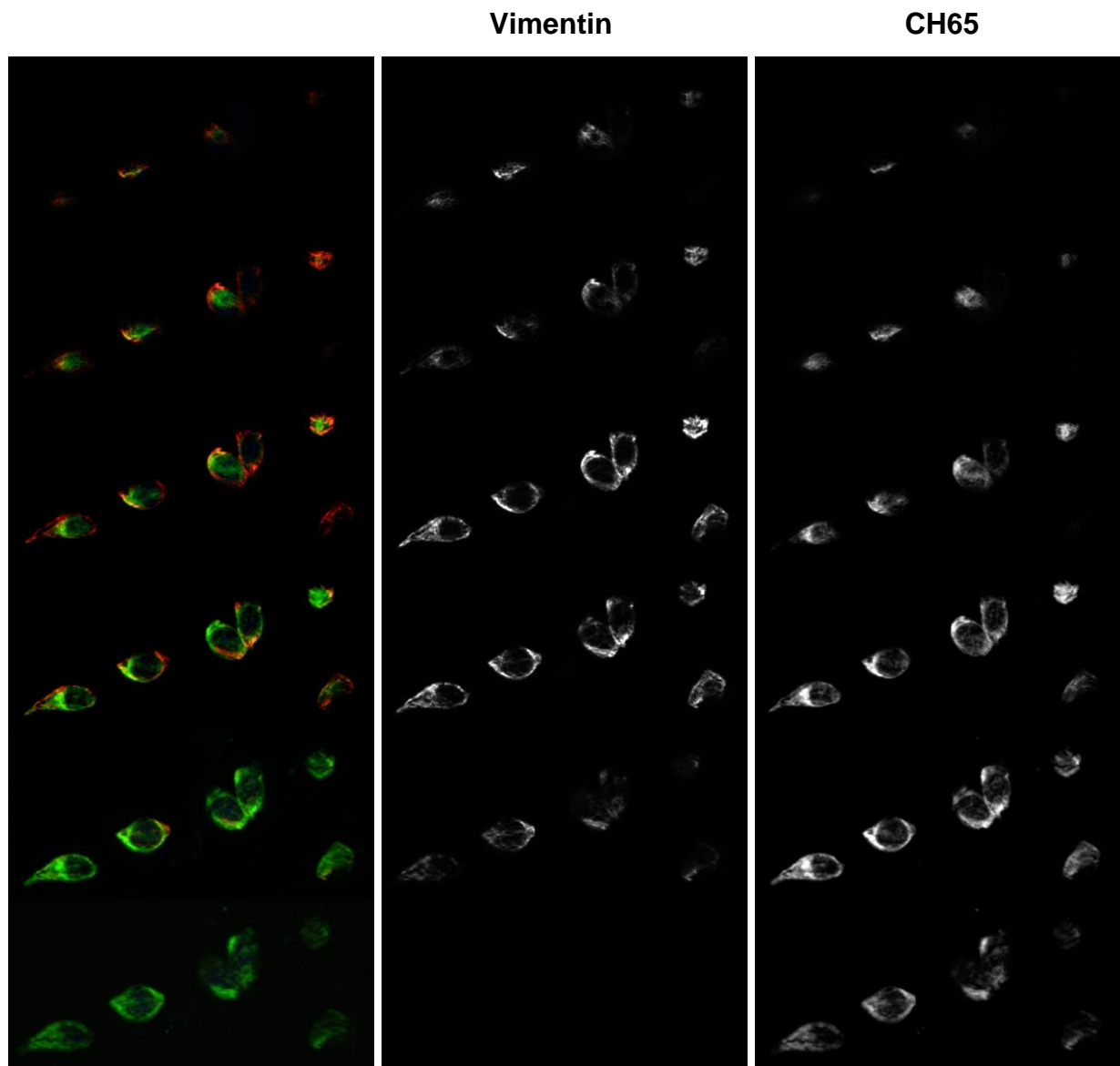


Abbildung 37: Galerieansicht z-Stapel (100x)

4.2.2 Die superficiale Schicht

Chondrozyten der superficiale Schicht unterscheiden sich hinsichtlich ihres Phänotyps von Chondrozyten anderer Zonen. Vertikale Schnitte durch das Knorpelgewebe zeigen abgeflachte Zellen, die dicht unter der Oberfläche liegen. Horizontale Betrachtungen der oberflächlichen Schicht weisen zum Teil auf eine rundliche seitliche Ausbreitung dieser Zellen hin.

Wie Abbildung 38 zeigt, können daneben Knorpelzellen nachgewiesen werden, die bis dato nur bei Osteoarthrose-Knorpel beschrieben wurden. Diese unterscheiden sich durch ihre zumeist längliche Form und durch mehrere Fortsätze von den anderen Zellen der oberflächlichen Schicht.

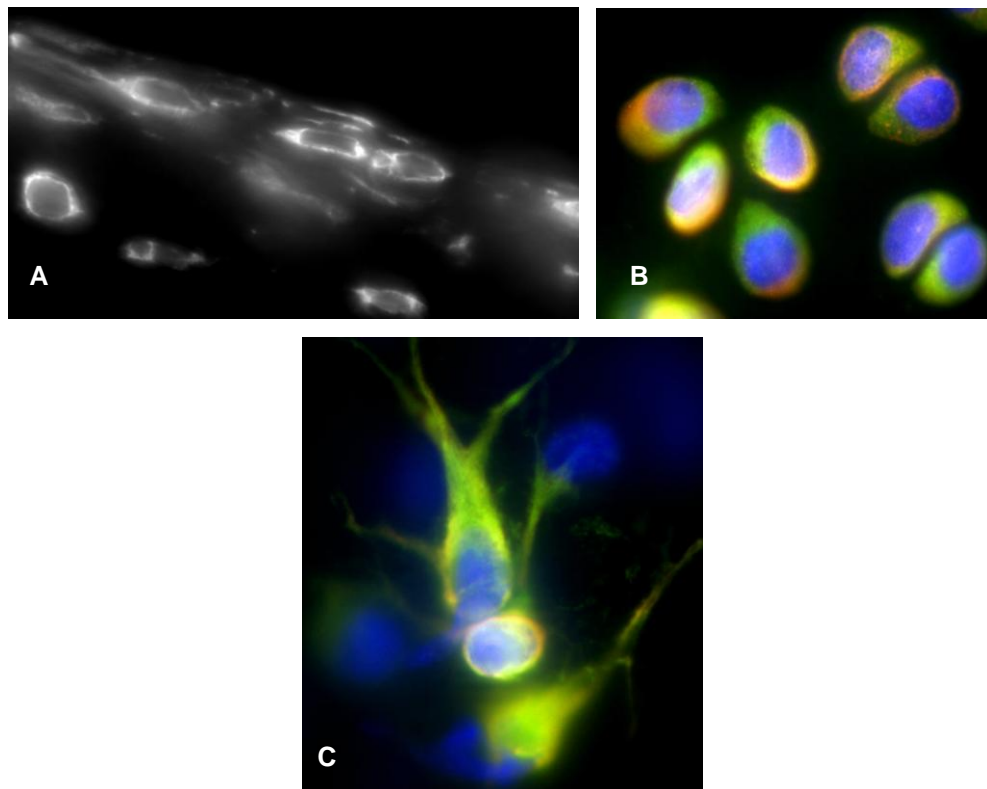


Abbildung 38: Chondrozyten der superficiale Zone

A: Vertikalschnitt durch das Gewebe

B/C: Horizontalaufsichten

Ungeachtet ihrer verschiedenen Morphologie weisen Chondrozyten der superficiale Zone sehr kompakte Netzwerke beider Intermediärfilamentproteine auf, die das gesamte Zytoplasma ausfüllen. Auch die Zellausläufer werden markiert. Vergleichbar zu den Zellen der mittleren und tiefen Schicht färben sich auch hier das Vimentin- als

auch das CH65-Netzwerk granulär an. Fibrillen sind nicht erkennbar. Auch Schwankungen der Signalintensität zeigen sich selten. Jedoch weisen die konventionellen Fluoreszenzmikroskop-Bilder auf Unterschiede der Verteilungsmuster beider Intermediärfilamentproteine hin. Dennoch kann aufgrund der Kompaktheit keine Aussage über eine mögliche Kolo-kalisation getroffen werden (s. Abb. 39).

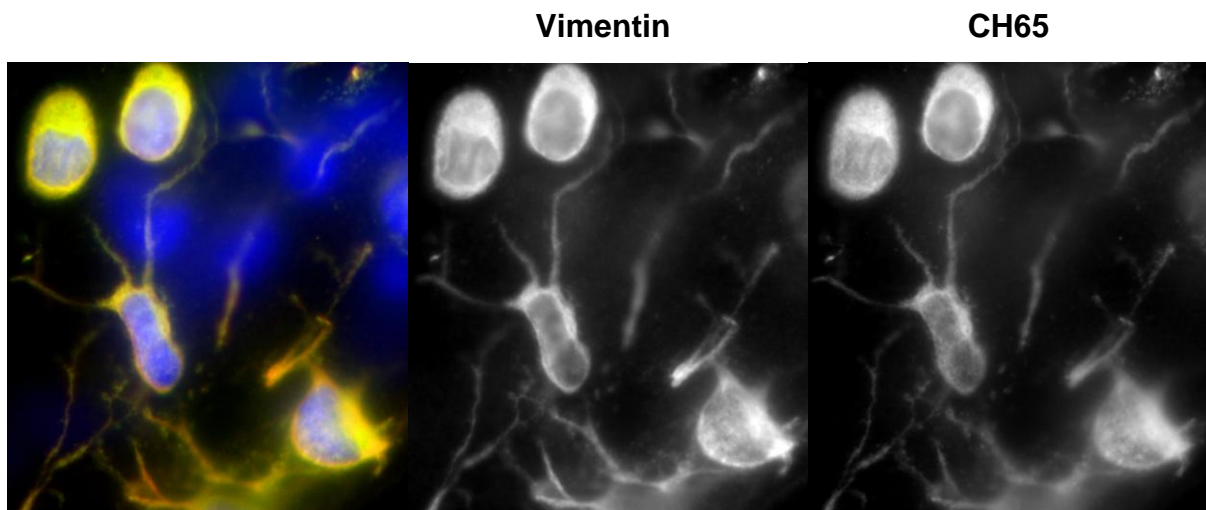
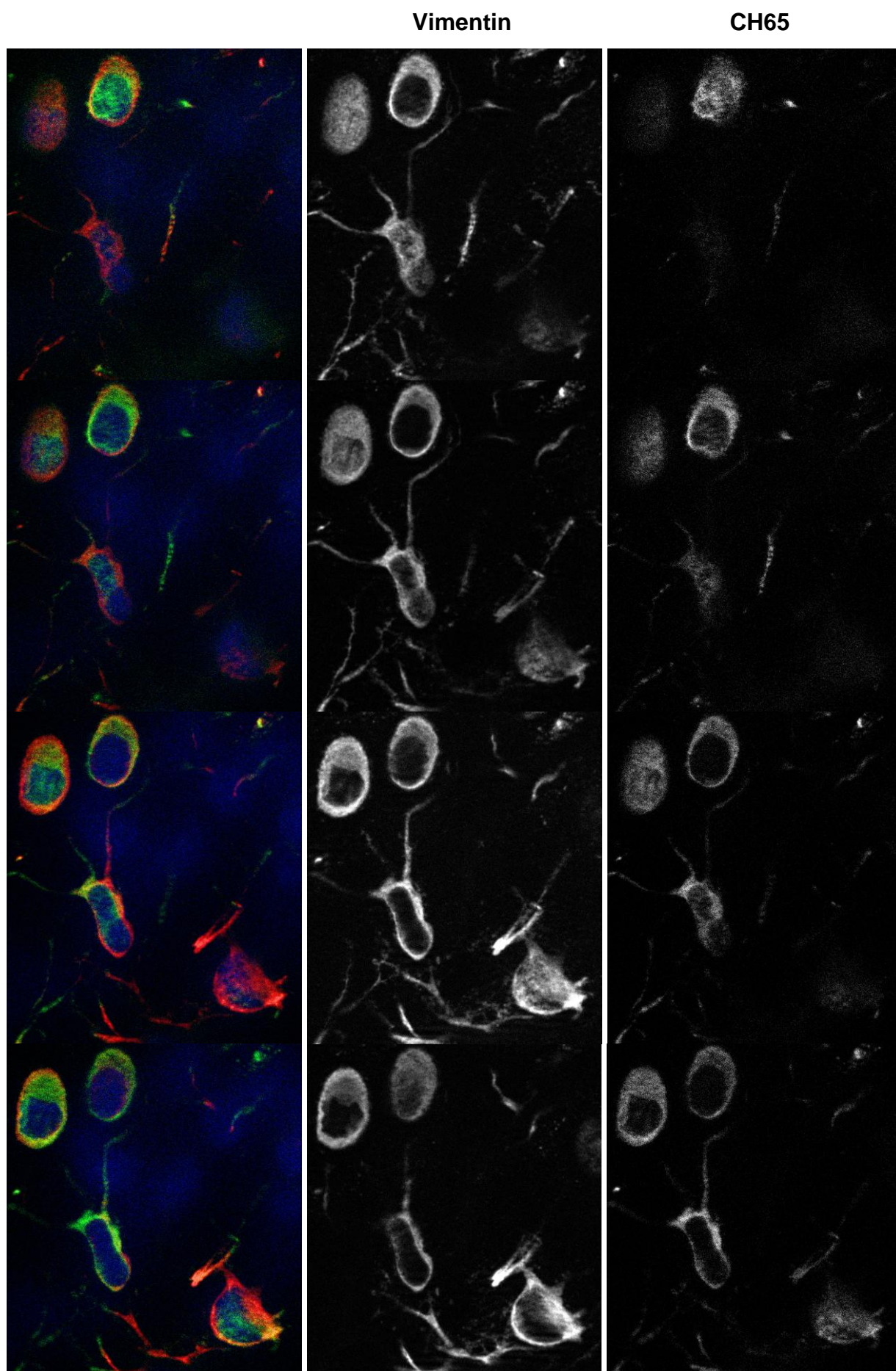


Abbildung 39: Horizontalaufnahme superficialer Chondrozyten (100x)

Trotz der höheren sichtbaren Auflösung ermöglichen ApoTome-Bilder hier keine diffizilere Darstellung der einzelnen Netzwerke (s. Abb. 40). Ähnlich der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erkennt man lediglich zwei dichte granuläre Färbemuster, die sich innerhalb des gesamten Zytoplasma sowie vorhandener Zellausläufer erstrecken. Hingegen verdeutlichen die einzelnen Schnittbilder die räumliche Verteilung beider Netzwerke innerhalb der Zelle. Zur Knorpeloberfläche parallele Schnitte zeigen, dass auch hier das Netzwerk von Vimentin das von CH65 fast vollständig umgibt. Nur auf der in die Tiefe zeigenden Seite bildet das CH65-Netzwerk den Abschluss. Daneben erkennt man, dass in Ebenen, in denen sowohl CH65 als auch Vimentin Signale zeigen, oftmals verschiedene Verteilungsmuster vorherrschen und nicht dieselben Regionen von beiden Intermediärfilamenten markiert werden.

Ferner erkennt man, dass Zellen mit Fortsätzen nicht parallel zur Knorpeloberfläche liegen, sondern die Fortsätze in Richtung Oberfläche ragen.



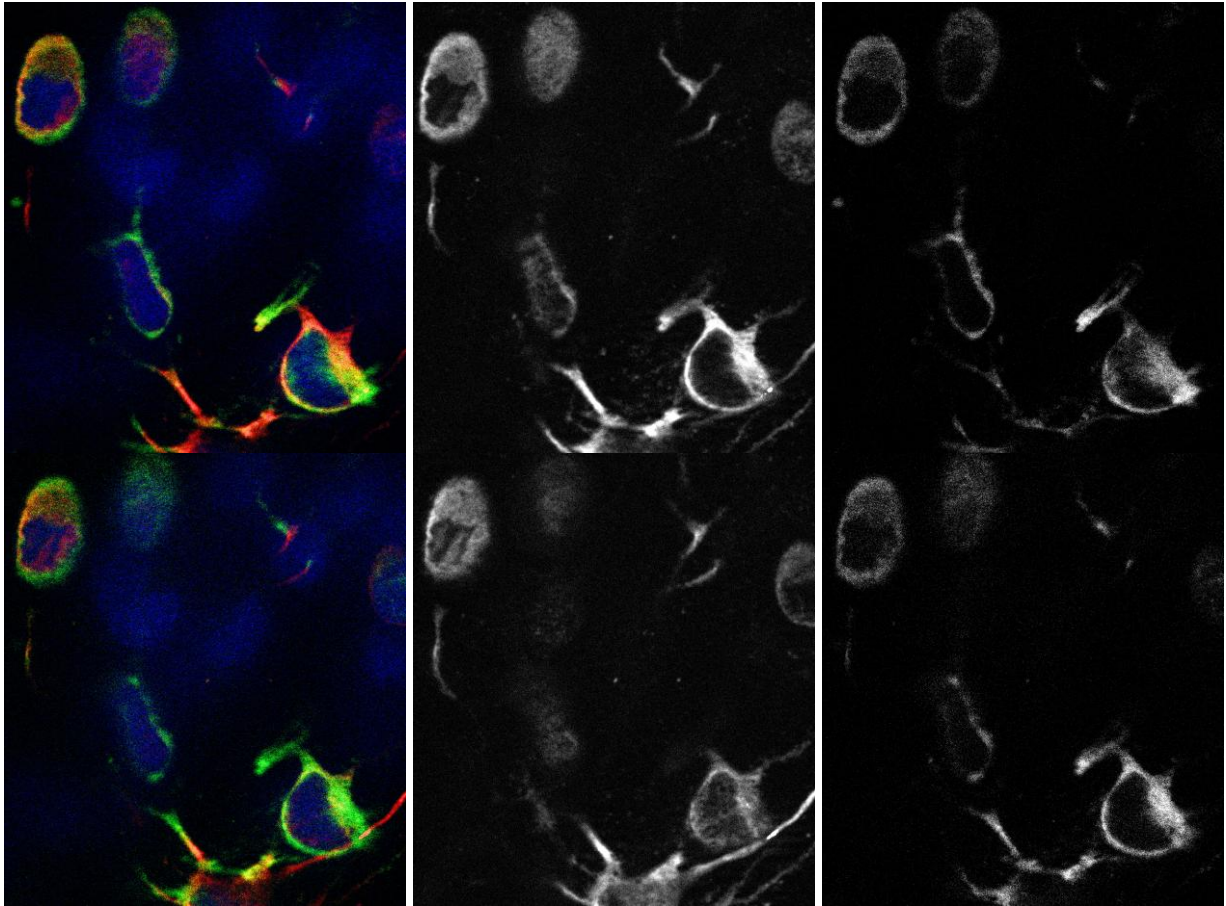


Abbildung 40: optische Schnitte durch die oberflächliche Zone (100x)

5 Diskussion

Vorangegangene biochemische Untersuchungen an Knorpelzellen zeigten große Ähnlichkeiten der beiden Intermediärfilamente CH65 und Vimentin, ohne jedoch eine definitive Aussage über eine intrazelluläre, raumstrukturelle Kongruenz beider Filament-Spezies treffen zu können (Casey 1998).

Dieser grundsätzliche Befund wurde zum Anlass eines immunhistologischen Strukturvergleiches von CH65 und Vimentin in der vorliegenden Arbeit genommen.

Frühere Studien zeigten, dass bei Expression mehrerer Typen von IF-Proteinen in einer Zelle entweder ein gemeinsames Netzwerk oder aber auch separate Raumstrukturen geformt werden können (Lazarides 1980, Traub 1985). Die vorliegenden Untersuchungen ergaben für CH65 und Vimentin zwei voneinander verschiedene Netzwerkstrukturen. Sowohl in der *In-vitro*-Kultivierung als auch bei den nativen Gewebepreparaten fanden sich eher zwei Netzwerke mit sehr ähnlicher Raumarchitektur, da keine eindeutige Kolo-kalisation der Filamente gezeigt werden konnte. Das CH65-Netzwerk wies eine vorwiegend granuläre Feinstruktur auf, während sich Vimentin als ein organisiertes, strangförmiges Netzwerk darstellte.

Die Validität dieser Ergebnisse wurde dabei durch den Einsatz einer optimierten Fixationslösung, vergleichender immunhistochemischer Einzeldarstellungen von CH65 und Vimentin sowie durch Wechsel der Reihenfolge beider Erstantikörper bei Doppeldarstellungen gesichert.

Auf dem Boden dieser Befunde konnte in dieser Studie überzeugend gezeigt werden, dass CH65 und Vimentin innerhalb der Zelle zwei separate Netzwerke ausbilden, die grundlegend große Ähnlichkeit aber keine Identität aufweisen.

So eindeutig diese differente Netzwerkorganisationen von Vimentin und CH65 auch ist, so unklar bleibt ihre funktionelle Bedeutung.

In diesem Zusammenhang sind zurückliegende Studien von Interesse. Durch sie konnte eine Beteiligung des chondrozyten-spezifischen CH65 an Krankheitsprozessen rheumatoider Arthritis aufgewiesen werden (Bang et al. 1994, Feige et al. 1994).

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste chronisch-entzündliche, knorpeldestruierende Gelenkserkrankung weltweit mit einer Prävalenz von 1% (Dejaco et al. 2006). Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der es bei genetisch disponierten Personen zu einer Infiltration der Synovialis mit autoreaktiven

Entzündungszellen kommt. Folge davon sind vor allem Synovialitis, Pannusbildung und Knorpel- und Knochendestruktion (Herold et al. 2006). Charakteristisch für die RA ist das Vorhandensein von spezifischen Autoantikörpern, so genannten Anti-Sa Antikörpern, die im Serum der Patienten nachgewiesen werden können (El-Gabalawy und Wilkins 2004, Bang et al. 2007). Diese weisen eine Spezifität von 99% und eine Sensitivität von rund 40% für die Rheumatoidarthritis sowie einen positiven Vorhersagewert von 95-99% auf (Despres et al. 1994, Menard et al. 2000).

Auffällig ist, dass Anti-Sa Antikörper zur Familie anticitrullinierter Protein-/Peptidantikörper gehören, woraus abgeleitet werden kann, dass Citrullinierung von Proteinen offensichtlich einen kritischen Prozess in der Pathogenese der rheumatischen Gelenkentzündung darstellt (Vossenaar et al. 2004, Bang et al. 2007).

Durch diese wesentliche Entdeckung hat gerade das Vimentin an neuer Aktualität gewonnen, nachdem ermittelt wurde, dass citrulliniertes Vimentin einem, für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis hoch spezifischen Sa-Antigen entspricht (Vossenaar et al. 2004). Wichtig ist dabei die Erkenntnis, dass die Arthritis induzierende Antigenität von Vimentin im Wesentlichen erst durch dessen Citrullinierung ausgelöst wird (Hill et al. 2003, Vossenaar et al. 2004).

In vivo, d.h. im intakten Knorpelgewebe, liegt Vimentin gewöhnlich im nicht-citrullinierten Zustand in der Knorpelzelle vor. Unabhängig davon werden post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Citrullinierung beobachtet. Citrullinierungsprozesse wurde *in vivo* bisher lediglich in sterbenden Makrophagen beschrieben und deshalb eng mit Apoptosemechanismen in Beziehung gebracht (Asaga et al. 1998, Vossenaar et al. 2004). Unter krankheitsrelevanten Milieubedingungen, d.h. unter pathologischem Stress, kommt es zu vermehrtem Influx von Ca^{2+} -Kationen in den Chondrozyten und zur Aktivierung zytosolischer Ca^{2+} -abhängiger Desaminasen (Peptidylarginin Desaminasen /PADs); Vorgänge, die über Deaminierung von Argininresten zur Bildung von Citrullin führen (El-Gabalawy und Wilkins 2004, Vossenaar et al. 2004). Ein herausragendes Substrat für derartige Prozesse stellt u.a. das argininreiche Vimentin dar. Vimentin enthält insgesamt 46 Argininreste, von denen theoretisch jeder Rest citrulliniert werden kann. Daraus resultiert eine große Variation citrullinierter Epitope. Die Konversion des basischen Arginin zum neutralen bis sauren Citrullin bedingt aufgrund des so entstehenden großen Ladungsunterschiedes die Immunogenität und führt ferner zu einer Zunahme

des Molekulargewichtes des Proteins (Bang et al. 2007). Vossenaar et al. (2004) zeigte in einer eindrucksvollen Studie, dass citrulliniertes Vimentin ein Molekulargewicht von ca. 65kDa aufweisen kann. Darüber hinaus wird in der Literatur interessanterweise beschrieben, dass Citrullinierung von Vimentin *in vitro* zu einer Disassemblierung der Vimentinfilamente führt (Inagaki et al. 1989)

Auffällig ist, dass das von Vossenaar beschriebene, durch Vimentin-Citrullinierung erhöhte Molekulargewicht zugleich dem des CH65 entspricht (Casey 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für das CH65 ein vergleichsweise unorganisiertes, granuläres Signalmuster im Vergleich zu einem organisierten strangförmig verlaufenden, intakten Vimentin-Netzwerk.

Vor diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass das CH65-Netzwerk eher einem disassemblierten, citrullinierten Vimentin-Netzwerk entsprechen könnte und somit in Chondrozyten sowohl ein assembliertes als auch ein unassembliertes Vimentin-Netzwerk vorliegt. Es wird vermutet, dass beide Netzwerke in einem Gleichgewicht miteinander stehen und ineinander übergehen können.

Dieses gleichzeitige Vorkommen von nicht assemblierten und assemblierten Intermediärfilament-Untereinheiten in Form eines dynamischen Gleichgewichtes wurde im Übrigen bereits von Skalli und Goldman (1991) vermutet, basierend auf Ergebnisse von Fluoreszenz-Energietransferexperimenten und lichtmikroskopischen Beobachtungen.

Die oben genannten Resultate eröffnen daher den Weg zu der Hypothese, dass CH65 citrulliniertem Vimentin entspricht und damit gleichzeitig das Sa-Antigen repräsentiert.

Bisherige Studien beschrieben citrulliniertes Vimentin bzw. Sa-Antigen als hoch spezifische Antigene für die rheumatoide Arthritis und wiesen Anti-Sa Antikörpern eine Spezifität von ca. 99% nach, gestützt auf Untersuchungen von Patienten-Sera sowie Fibroblasten und Makrophagen der Synovia (Despres et al. 1994, Menard et al. 2000, Bang et al. 2007). Bei bestehender Rheumatoidarthritis konnte das Sa-Antigen bzw. das citrullinierte Vimentin dabei bereits in präklinischen Stadien nachgewiesen werden und gilt ferner als prognostischer Marker für das Outcome der Krankheit (Vossenaar et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde das CH65 jedoch in gesunden Knorpelzellen *in vitro* wie *in vivo* gefunden, so dass die Mutmaßung besteht, dass Knorpelgewebe im Gegensatz zu anderen Geweben citrulliniertes Vimentin als normale Variante

exprimiert. So wies Casey (1997) CH65 mittels biochemischer Untersuchungen bereits im embryonalen Knorpelgewebe nach.

Da jedoch eine Beteiligung des chondrozytären CH65 an Krankheitsprozessen der humanen chronischen Polyarthrits und bei tierexperimentellen Modellen der rheumatoiden Arthritis bereits gefunden wurde (Bang et al. 1994, Feige et al. 1994), scheint es, dass im Rahmen der Knorpeldestruktion bei rheumatischer Gelenksentzündung möglicherweise lediglich eine Verschiebung des dynamischen Gleichgewichtes zugunsten des CH65 vorliegt.

Unklar ist, wodurch das Vimentin-/CH65-Gleichgewicht verschoben werden kann. Es kann aber vermutet werden, dass aus aktivierten Lymphozyten und Makrophagen bei florider Arthritis inflammatorische Zytokine in die Synovialis freigesetzt werden (Herold et al. 2006), die einen Vimentin-Disassemblierungs-Effekt in der Knorpelzelle hervorrufen. Inwieweit Apoptose betroffener Knorpelzellen hierdurch induziert wird, bleibt offen und erfordert weitergehende Untersuchungen. Wohl aber sind Funktionseinbußen bei Überexpression von CH65 in Knorpelzellen zu erwarten.

Ausgehend davon, dass eine enge Wechselbeziehung zwischen Zellfunktion und Organisation des Zytoskeletts prinzipiell besteht (Langelier et al. 2000), bedarf dies einer besonderen Betrachtung.

Wie bereits früher beschrieben (Linss et al. 1986), konnte für beide Intermediärfilamente in der *In-vitro*-Kultivierung jeweils ein intrazelluläres, dreidimensionales Netzwerk gezeigt werden, welches die gesamte Zelle von der Zellmembran bis zur Zellkernmembran durchspannt. Perinukleäre, dicht gepackte Filamentbündel erscheinen besonders prominent. Die hier vorgelegten lichtoptischen Untersuchungen bestätigten dies für Vimentin ebenso wie für CH65.

Darüber hinaus konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass sich Vimentin als ein gut organisiertes Netzwerk darstellt, welches mit filigranen Strängen in vorwiegend der Knorpeloberfläche parallel orientierter horizontaler Ausbreitungsrichtung das Zytoplasma durchzieht. Frühere Studien zeigten, dass Intermediärfilamente eine Rolle in der Mechanotransduktion spielen und ferner ein gesteuertes Transportsystem für mRNA darstellen (Lazarides 1980, Skalli und Goldman 1991). Überträgt man diese Funktionen auf die in dieser Arbeit dargestellte

Netzwerkorganisation des Vimentins, kann eine solche, enge Korrelation gut nachvollzogen werden.

CH65 hingegen weist eine eher gering organisierte, granuläre zytoplasmatische Raumarchitektur und einen vorrangig vertikalen Faserverlauf auf. Trotz der Dissoziation zu Granula lässt sich aber auch hier noch eine Netzwerkgrundstruktur erkennen. Vor dem Hintergrund der oben genannten Vimentin-Funktionalität entsteht so jedoch der Gedanke eines weniger suffizienten Signal- und Transportsystems des CH65-Raumnetzes verglichen mit dem des Vimentins. Da Studien CH65 bereits per se als Autoantigen in der RA definierten (Feige et al. 1994, Bang et al. 1994), könnte ein solcher Funktionalitätsverlust die Autoantigenität sowie die Pathogenese der RA begünstigen und schließlich über den Circulus vitiosus weitere Funktionalitätseinbußen bedingen. Hieraus ergäbe sich eine eigenzentrierte Progression pathogenetischer Teilprozesse bei der Rheumatoidarthritis mit fortschreitendem zellulären Funktionsverlust.

Da in der gesunden Knorpelzelle *in vitro* beide Netzwerke nebeneinander etabliert sind, stellt sich die Frage, welche Konsequenzen dieses Vimentin/CH65 Gleichgewicht als Ausdruck einer dynamischen Netzwerkarchitektur für die Funktionalität der Knorpelzelle unter intakten normalen Milieuverhältnissen hat.

Die Darstellung der Verteilungsmuster beider Netzwerke in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass das CH65 Netzwerk stets strenger perinukleär lokalisiert ist im Vergleich zum Vimentin. Überträgt man die funktionale Suffizienz der gesunden Knorpelzelle auf diese Netzwerkanordnung, so scheint es, dass die Regulation von mechanischem Stress zwischen Chondrozyten und der umgebenden extrazellulären Matrix sowie das Signal- und Transportsystem vor allem durch die Raumstruktur des Vimentins aufrechterhalten wird. Dennoch lässt sich, trotz der vermeintlich weniger suffizienten Funktionalität des CH65 *in vitro* mit zunehmender Kultivierungsdauer keine Elimination auffinden, so dass man schlussendlich davon ausgehen muss, dass auch das CH65 in irgendeiner Form zur Funktionalität der intakten Knorpelzelle beiträgt.

Auch in den gewebständigen Chondrozyten konnte in der vorliegenden Arbeit die Expression beider Intermediärfilamentproteinen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich für beide Intermediärfilamente exakt die Charakteristika, die auch schon in der *In-vitro*-Kultivierung beobachtet werden konnten. Vimentin zeigte sich in der Knorpelzelle

der mittleren und tiefen Schicht des Gelenkknorpels als ein aus strangförmig verlaufenden Filamenten zusammengesetztes Netzwerk, während sich das CH65 auch hier vordergründig granulär darstellte. Auch das spezifische Verteilungsmuster, dass Vimentin stärker peripher im Zytoplasma lokalisiert ist als CH65, konnte *in vivo* wieder gefunden werden.

Durch den Nachweis gleichartiger Netzwerkstrukturen wie in der *In-vitro*-Kultivierung kann die oben genannte Verknüpfung zwischen Funktion und Zytoskelettorganisation somit auch *in vivo* vertreten werden. Auch hier scheint die funktionale Suffizienz der Knorpelzelle vor allem durch die Raumstruktur des Vimentin-Netzwerkes aufrecht gehalten zu werden.

Schlussendlich untermauern die in den gewebständigen Chondrozyten aufgezeigten gleichartigen Netzwerkstrukturen so die oben aufgestellte Hypothese, dass CH65 citrulliniertem Vimentin entspricht und damit gleichzeitig das Sa-Antigen repräsentiert.

6 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass Vimentin und CH65 im bovinen Chondrozyten keine intrazelluläre raumstrukturelle Kongruenz, jedoch eine sehr ähnliche Netzwerkgrundstruktur aufweisen.

Die Verknüpfung der gegenwärtigen Befunde mit in der Literatur beschriebenen Studienergebnissen lässt vermuten, dass CH65 aufgrund seiner granulären Netzwerkgrundstruktur und seines Molekulargewichtes von 65kDa citrulliniertem Vimentin entspricht. Daraus folgt, dass gesundes Knorpelgewebe citrulliniertes Vimentin zusätzlich als normale Variante exprimiert und assemblierte Filamente neben disassemblierten in einem Gleichgewicht vorliegen.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich mehrere Fragen, die in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden müssen:

- Entspricht CH65 citrulliniertem Vimentin?
- Welche Rolle spielt das CH65-/Vimentin-Gleichgewicht für die Funktionalität der Zelle?
- Kommt es im alternden Chondrozyten *in vivo* zu Änderungen dieses Gleichgewicht?
- Inwiefern induziert die Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Disassemblierung die Apoptose der Zelle?

Da citrulliniertes Vimentin zugleich dem Sa-Antigen und damit einem, für die Rheumatoidarthritis hoch spezifischem Antigen entspricht, stellt sich ferner die Frage, inwiefern eine Verschiebung des Assemblierung-Disassemblierung-Gleichgewichtes die Pathogenese der rheumatischen Arthritis vorantreibt.

Die Beantwortung dieser Fragen stellt unter dem Gesichtspunkt, dass derzeitige Studien in der Untersuchung auf Antikörper gegen citrullinhaltige Peptide einen Profit für die Diagnostik der RA aufweisen, eine nicht unwichtige Aufgabe dar.

7 Literaturverzeichnis

- Arcangeletti C, Sutterlin R, Aebi U, De Conto F, Missorini S, Chezzi C, Scherrer K. 1997. Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and actin networks by "instantaneous fixation" preserving the cytoskeleton. *J Struct Biol*, 119 (1):35-58.
- Asaga H, Yamada M, Senshu T. 1998. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 243 (3):641-646.
- Aydelotte MB, Kuettner KE. 1988. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res*, 18 (3):205-222.
- Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE. 1988. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res*, 18 (3):223-234.
- Aydelotte MB, Raiss RX, Caterson B, Kuettner KE. 1992. Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect Tissue Res*, 28 (1-2):143-159.
- Bang H, Mollenhauer J, Schulmeister A, Nager C, van Eden W, Wand-Wurtenberger A, Kaufmann SH, Brune K. 1994. Isolation and characterization of a cartilage-specific membrane antigen (CH65): comparison with cytokeratins and heat-shock proteins. *Immunology*, 81 (2):322-329.
- Bang H, Egerer K, Gauliard A, Luthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, Berg W, Feist E, Burmester GR. 2007. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 56 (8):2503-2511.
- Baschong W, Duerrenberger M, Mandinova A, Suetterlin R. 1999. Three-dimensional visualization of cytoskeleton by confocal laser scanning microscopy. *Methods Enzymol*, 307:173-189.
- Benjamin M, Archer CW, Ralphs JR. 1994. Cytoskeleton of cartilage cells. *Microsc Res Tech*, 28 (5):372-377.
- Benjamin M, Ralphs JR, Archer CW, Mason RM, Chambers M. 1995. Cytoskeletal changes in articular fibrocartilage are an early indicator of osteoarthritis in STR/ORT mice. *Trans Orthop Res Soc*, 41:246.
- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30:215-224.
- Benya PD, Padilla S, Nimni ME. 1978. Independent regulation of collagen types of chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15:1313-1321.

- Benya PD, Brown PD, Padilla SR. 1988. Microfilament modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid-modified chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Biol Chem*, 106:161-170.
- Blanc A, Tran-Khanh N, Fillion D, Buschmann MD. 2005. Optimal processing method to obtain four-color confocal fluorescent images of the cytoskeleton and nucleus in three-dimensional chondrocyte cultures. *J Histochem Cytochem*, 53 (9):1171-1175.
- Bohme K, Winterhalter KH, Bruckner P. 1995. Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp Cell Res*, 216 (1):191-198.
- Bonen DK, Schmid TM. 1991. Elevated extracellular calcium concentrations induce type x collagen synthesis in chondrocyte cultures. *J Cell Biol*, 115:1171.
- Capin-Gutierrez N, Talamas-Rohana P, Gonzalez-Robles A, Lavallo-Montalvo C, Kouri JB. 2004. Cytoskeleton disruption in chondrocytes from a rat osteoarthrotic (OA) -induced model: its potential role in OA pathogenesis. *Histol Histopathol*, 19 (4):1125-1132.
- Casey RC. 1998. Characterization of bovine CH65 Chicago: Rush University.
- Cooke TD, Sumia M, Elliott S, Maeda M. 1983. Immune complex mediated destruction of cartilage in antigen-induced arthritis of rabbits. *J Rheumatol Suppl*, 11:103-107.
- Dejaco C, Klotz W, Larcher H, Duftner C, Schirmer M, Herold M. 2006. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 8 (4):R119.
- Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 21 (6):1027-1033.
- Drenckhahn D, Hunziker EB. 2003. Knorpelgewebe. In: Benninghoff, Hrsg. *Anatomie*. Aufl. Urban & Fischer,
- Durrant LA, Archer CW, Benjamin M, Ralphs JR. 1999. Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. *J Anat*, 194 (Pt 3):343-353.
- Dustmann HO, Puhl W, Krempien P. 1974. Die Zellteilung im Gelenkknorpel. *Arch Orthop Unfall-Chirurgie*, 79:171-182.
- Eggli PS, Hunzicker EB, Schenk RK. 1988. Quantitation of structural features characterizing weight and less-weight bearing regions in articular cartilage: A stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec*, 222:217-227.
- El-Gabalawy HS, Wilkins JA. 2004. Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6 (2):86-89.
- Feige U, Schulmeister A, Mollenhauer J, Brune K, Bang H. 1994. A constitutive 65 kDa chondrocyte protein as a target antigen in adjuvant arthritis in Lewis rats. *Autoimmunity*, 17 (3):233-239.

- Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (10):5034-5038.
- Fuchs E, Weber K. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345-382.
- Ghadially FN. 1983. the fine structure of synovial joints. Aufl. London: Butterworths & Co Ltd.
- Guilak F. 1995. Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech*, 28:1529-1541.
- Handley CJ, McQuillan DJ, Campbell MA, Bolis S. 1986. Steady state metabolism in cartilage explants. Aufl. New York: Raven Press.
- Hauselmann HJ, Oppliger L, Michel BA, Stefanovic-Racic M, Evans CH. 1994. Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett*, 352 (3):361-364.
- Hauselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar EJ, Shinmei M, Kuettner KE, Aydelotte MB. 1996. The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum*, 39 (3):478-488.
- Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. 2003. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*, 171 (2):538-541.
- Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. 1960. The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 46 (12):1533-1542.
- Horwitz AL, Dorfmann A. 1968. Subcellular sites for synthesis of chondromucoprotein of cartilage. *J Cell Biology*, 38:358-368.
- Idowu BD, Knight MM, Bader DL, Lee DA. 2000. Confocal analysis of cytoskeletal organisation within isolated chondrocyte sub-populations cultured in agarose. *Histochem J*, 32 (3):165-174.
- Inagaki M, Takahara H, Nishi Y, Sugawara K, Sato C. 1989. Ca²⁺-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J Biol Chem*, 264 (30):18119-18127.
- Ingber DE. 1993a. The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering? *Cell*, 75 (7):1249-1252.
- Ingber DE. 1993b. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci*, 104 (Pt 3):613-627.

- Ingber DE, Dike L, Hansen L, S. K, Liley H, Maniotis A, Mcnamee H, Mooney D, Plopper G, Sims J, Wang N. 1994. Cellular tensegrity: Exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis. *Internat Rev Cytol*, 150:173-224.
- Jahn B, Burmester GR, Schmid HJ, al e. 1986. Changes in cell surface antigen expression on human articular chondrocytes induced by interferon. *Arthritis Rheum*, 29 (1)
- Janmey PA. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev*, 78 (3):763-781.
- Jasin HE. 1995. Structure and function of the articular cartilage surface. *Scand J Rheumatol Suppl*, 101:51-55.
- Kuettner KE. 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*, 25 (3):155-163.
- Kuettner KE. 1994. *Rheumatology*. Aufl. London, UK: Mosby.
- Langelier E, Suetterlin R, Hoemann CD, Aebi U, Buschmann MD. 2000. The chondrocyte cytoskeleton in mature articular cartilage: structure and distribution of actin, tubulin, and vimentin filaments. *J Histochem Cytochem*, 48 (10):1307-1320.
- Lazarides E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, 283:249-256.
- Linss W, Neupert G, Langbein L. 1986. [Intermediate filaments in cells of hyaline cartilage]. *Acta Histochem*, 80 (1):29-34.
- Mallein-Gerin F, Garrone R, Van der Rest M. 1991. Proteoglycan and collagen synthesis are correlated with actin organisation in dedifferentiating chondrocytes. *Eur J Cell Biol*, 56:364-373.
- Marles P, Hoyland J, Parkinson R, Freemont A. 1991. Demonstration of variation in chondrocyte activity in different zones of articular cartilage: an assessment of the value of in-situ hybridization. *Int J Exp Pathol*, 72:171-182.
- Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ. 1976. Changes in the type of collagen synthesised as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73:1674-1678.
- Menard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ. 2000. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res*, 2 (6):429-432.
- Mollenhauer J, Kuettner KE. 1997. Articular cartilage. In: *Principles of Orthopaedic Practice* (Dee R HL, Gruber M, Kottmeier S), Hrsg. Aufl. McGraw-Hill, 85-95.
- Mow VC, Hayes WC. 1991. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Hrsg. Basic Orthopaedic Biomechanics*. Aufl. Raven Press,

- Oegma TR, Thompson RCJ. 1986. Metabolism of chondrocytes derived from normal and osteoarthritic human cartilage. Aufl. New York: Raven Press.
- Oegma TR, Thompson R. 1990. Cartilage-bone interface (tidemark). Aufl. Indianapolis: Indiana School of Medicine Publishers.
- Palfrey A, Davies D. 1966. The fine structure of chondrocytes. *J Anat*, 100:213-226.
- Parry DA, Steinert PM. 1992. Intermediate filament structure. *Curr Opin Cell Biol*, 4 (1):94-98.
- Paukkonen K, Helminen HJ. 1987. Chondrocyte ultrastructure in exercise and experimental osteoarthrosis. A stereologic morphometric study of articular cartilage of young rabbits using transmission electron microscopy. *Clin Orthop Rel Res*, 224:284-288.
- Poole CA. 1997. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 191 (Pt 1):1-13.
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. 1987. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res*, 5 (4):509-522.
- Poole CA, Matsouka A, Schofield JR. 1991. Chondrons from articular cartilage: III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrocytes isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 34:22
- Revell JP, Hay ED. 1963. An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 61:110-144.
- Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T. 1995. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol*, 131:483.
- Ross R. 1975. Connective tissue cells, cell proliferation and synthesis of extracellular matrix - a review. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 271:247-259.
- Schenk RK, Egli PS, Hunzicker EB. 1986. Articular cartilage morphology. In: Hrsg. Articular cartilage biochemistry (Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC (eds)). Aufl. New York: Raven Press, pp 3-22.
- Schliwa M, van Blerkom J. 1981. Structural interaction of cytoskeletal components. *J Cell Biol*, 90 (1):222-235.
- Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, al e. 1994. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*:311:144.
- Skalli O, Goldman RD. 1991. Recent insights into the assembly, dynamics, and function of intermediate filament networks. *Cell Motil Cytoskeleton*, 19 (2):67-79.

- Skalli O, Chou YH, Goldman RD. 1992. Intermediate filaments: not so tough after all. *Trends Cell Biol*, 2 (10):308-312.
- Sokoloff F. 1980. In vitro culture of joints and articular tissues. Aufl. London: United kingdom edition. Academic Press Inc.
- Solursh M, Meier S. 1974. Effects of cell density on the expression by chick embryo chondrocytes. *J Exp Zool*, 187:311-322.
- Sprinz R, Stockwell RA. 1976. Changes in articular cartilage following injection of tritiated gyceryl triolate. *J Anat*, 122:91-112.
- Stockwell RA. 1978. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 12:7-13.
- Stockwell RA, Meachim G. 1973. The chondrocytes. Aufl. London: Pitman Medical.
- Takagi T, Jasin H. 1992. Interactions of synovial fluid immunoglobulins with chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 35 (1502)
- Traub P. 1985. Intermediate Filaments. Aufl. Berlin: Springer Verlag.
- Traub P. 1995. Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 27:377-400.
- von der Mark K. 1986. Differentiation, modulation, and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology*, 10:272-315.
- von der Mark K, Conrad G. 1979. Cartilage cell differentiation: review. *Clin Orthop Relat Res*, (139):185-205.
- Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Menard HA. 2004. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther*, 6 (2):R142-150.
- Wang N, Butler JP, Ingber DE. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260:1124-1127.
- Watt FM, Dudhia J. 1988. Prolonged expression of differentiated phenotype by chondrocytes cultured at low density on a composite substrate of collagen and agarose that restricts cell spreading. *Differentiation*, 38:140-147.

8 Anhang

8.1 *Lebenslauf*

Persönliche Daten

Name, Vorname	Janke, Yvonne
Geburtsdatum, -ort	14.11.1981, Hamburg

Schulische Ausbildung

1988-1992	Grundschule Nord, Halstenbek
1992-2000	Wolfgang-Borchert-Gymnasium, Halstenbek
2000-2002	Geschwister Scholl Gesamtschule, Hamburg

Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2004	Ablegung des Physikums
07/2005	Beginn der experimentellen Tätigkeiten für die vorliegende Dissertation

Jena, 23.01.2009

Yvonne Janke

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. K.-J. Halbhuber

Herr PD Dr. J. Mollenhauer

Frau Dr. A. Eitner

Frau C. Mollenhauer

Frau I. Lemke

Frau C. Müller

Frau Bernhardt

Herr Dr. O. Pullig

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 23.01.2009

Yvonne Janke

8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im Besonderen danke ich:

Herrn Prof. Dr. K.-J. Halbhuber für die Überlassung des Themas, die intensive Unterstützung, fachlichen Diskussionen und die Korrektur des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. J. Mollenhauer für seine kompetente Anleitung und stetige Betreuung im Forschungslabor sowie für seine konstruktive Kritik und die Durchsicht des Manuskriptes.

Frau Dr. A. Eitner für die freundliche Unterstützung bei der Anwendung der konfokalen Lasermikroskope.

Ganz herzlich möchte ich auch den Mitarbeitern des Forschungslabors des Rudolf-Elle-Krankenhauses in Eisenberg danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen: vor allem Frau C. Mollenhauer und Frau C. Müller, aber auch den Mitarbeiterinnen J. Schoemburg, J. Neuwirth und A. Rüttger.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.